

Untersuchungen zu den Volumenersatzlösungen Ringer und Ringer-Laktat sowie  
den Schutzstoffen Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Deferoxamin/LK 614 im  
schweren hämorrhagischen Schock der Ratte

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Chemie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Thomas Rönn

aus Neuwied

18.07.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2012

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Januar 2012 am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

Ich danke **Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot**,

dem leitenden Direktor des Instituts für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen, für die Bereitstellung einer wissenschaftlichen Arbeitsstelle und die Überlassung des interessanten Themas sowie die vielen wertvollen Ratschläge und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich

**Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann**

vom Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen.

Besonderer Dank gebührt dem Betreuer meiner Promotion,

**Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Petrat**,

für sein aufopferungsvolles Engagement während der wissenschaftlichen Begleitung dieser Arbeit, die guten Ideen sowie die fortwährende Geduld und stete Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich zudem **Frau Dr. Judith Fieker, Frau Indra Waack, Frau Julia Laudien** und **Herrn Tim Hamburger**,

ohne die meine Promotionszeit deutlich langweiliger gewesen wäre und natürlich allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

Ein ganz besonderer Dank gilt

**meiner Familie**,

die mich immer vorbehaltlos unterstützt und mir den Weg zur Promotion erst ermöglicht hat.

„Hiermit bestätige ich, die vorliegende Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.“

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1. Klinik des hämorrhagischen Schocks .....	9
1.2. Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung durch hämorrhagischen Schock .....	9
1.3. Klinische Therapie des hämorrhagischen Schocks .....	10
1.4. Tiermodelle des hämorrhagischen Schocks .....	11
1.5. Potentielle Schutzstoffe zur Gewebeprotektion im hämorrhagischen Schock .....	12
1.5.1. Glycin .....	13
1.5.2. Pyruvat .....	15
1.5.3. Resveratrol .....	16
1.5.4. Eisenchelatoren.....	17
1.5.4.1. Deferoxamin .....	17
1.5.4.2. LK 614.....	18
1.6. Potentielle synergistische Effekte durch Kombinationen von Schutzstoffen	19
1.7. Problemstellung und Ziele der Arbeit.....	21
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1. Material .....	23
2.1.1. Pharmaka und Chemikalien.....	23
2.1.2. Verbrauchsmaterial, Hilfsmittel und Geräte .....	24
2.2. Methoden.....	27
2.2.1. Die Versuchstiere .....	27
2.2.2. Anästhesie, Analgesie und Katheterisierung der Versuchstiere .....	27
2.2.3. Schockeinleitung, Schock und therapeutische Volumensubstitution .....	29
2.2.4. Euthanasie und Organentnahme.....	30
2.2.5. Die Versuchsgruppen .....	31

2.2.5.1. Versuchsserie zur Etablierung eines neuen Modells des schweren hämorrhagischen Schocks.....	31
2.2.5.2. Versuchsserie zum Vergleich der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung .....	32
2.2.5.3. Versuchsserie zur Protektion durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Deferoxamin/LK 614 .....	32
2.2.5.4. Versuchsserie zur Protektion durch Kombinationen der Einzelschutzstoffe .....	34
2.2.6. Biomonitoring.....	36
2.2.7. Blut- und Plasmaparameter .....	37
2.2.8. Makroskopische Beurteilung der Dünndarmschädigung .....	38
2.2.9. Histopathologische Beurteilung von Organschäden. ....	38
2.2.9.1. Dünndarm.....	39
2.2.9.2. Niere.....	40
2.2.9.3. Leber .....	41
2.2.9.4. Lunge .....	41
2.2.9.5. Herz.....	42
2.2.10. Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Gewebe des Dünndarms, der Niere, Leber und Lunge.....	42
2.2.11. Bestimmung des Lungen- und Dünndarmgewichtes sowie des Nass-Trocken-Gewichtes des Dünndarms .....	43
2.2.12. Quantifizierung von freiem Hämoglobin im Blutplasma (Hämolyse) .....	43
2.2.13. Statistik .....	43
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1. Ergebnisse der Versuchsreihe zur Modelletablierung.....	44
3.1.1. Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks auf die Vitalparameter.....	44
3.1.2. Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks auf die Blutgasanalyse, Elektrolytkonzentrationen und metabolische Parameter.....	47

3.1.3. Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks auf enzymatische Organschädigungsmarker und die Kreatininkonzentration im Blutplasma .....	53
3.1.4. Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks auf die Histopathologie und andere Schädigungsmarker in den Organen .....	55
3.2. Ergebnisse der Versuchsserie zum Vergleich von Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung .....	59
3.2.1. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf die Vitalparameter nach hämorrhagischem Schock .....	60
3.2.2. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf die Überlebenszeit nach hämorrhagischem Schock.....	60
3.2.3. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf die Blutgasanalyse, Elektrolytkonzentrationen und metabolische Parameter nach hämorrhagischem Schock.....	61
3.2.4. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf enzymatischen Organschädigungsmarker und die Kreatininkonzentration im Blutplasma nach hämorrhagischem Schock	64
3.2.5. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf die Histopathologie und andere Schädigungsmarker in den Organen nach hämorrhagischem Schock .....	64
3.3. Ergebnisse der Versuchsserie zur Protektion der Einzelschutzstoffe .....	68
3.3.1. Einfluss der Einzelschutzstoffe auf die Vitalparameter nach hämorrhagischem Schock .....	68
3.3.2. Einfluss der Einzelschutzstoffe auf die Blutgasanalyse, Elektrolytkonzentrationen und metabolische Parameter nach hämorrhagischem Schock .....	68
3.3.3. Einfluss der Einzelschutzstoffe auf enzymatische Organschädigungsmarker und die Kreatininkonzentration im Blutplasma nach hämorrhagischem Schock .....	70
3.3.4. Einfluss der Einzelschutzstoffe auf die Histopathologie und andere Schädigungsmarker in den Organen nach hämorrhagischem Schock..	71

3.4. Ergebnisse der Versuchsserie zur Protektion durch die Kombinationen der Schutzstoffe .....	74
3.4.1. Einfluss von Schutzstoffkombinationen auf die Vitalparameter nach hämorrhagischem Schock .....	74
3.4.2. Einfluss von Schutzstoffkombinationen auf die Blutgasanalyse, Elektrolytkonzentrationen und metabolische Parameter nach hämorrhagischem Schock .....	75
3.4.3. Einfluss von Schutzstoffkombinationen auf enzymatische Organschädigungsmarker und die Kreatininkonzentration im Blutplasma nach hämorrhagischem Schock .....	78
3.4.4. Einfluss von Schutzstoffkombinationen auf die Histopathologie und andere Schädigungsmarker in den Organen nach hämorrhagischem Schock.....	80
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
4.1. Tiermodell und Methodik.....	87
4.2. Ringer- vs. Ringer-Laktat-Lösung zur therapeutischen Volumensubstitution im hämorrhagischen Schock.....	91
4.3. Protektion durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Deferoxamin/ LK 614 ....	94
4.3.1. Glycin .....	94
4.3.2. Pyruvat .....	96
4.3.3. Resveratrol .....	98
4.3.4. Eisenchelatoren.....	100
4.4. Synergistische Effekte durch die Schutzstoffkombinationen .....	101
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>103</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>116</b>
7.1. Abkürzungsverzeichnis .....	116
7.2. Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit.....	117
7.3. Lebenslauf .....	118



## **1. Einleitung**

### **1.1. Klinik des hämorrhagischen Schocks**

Der hämorrhagische Schock ist charakterisiert als besondere Ausprägung des hypovolämischen Schocks und wird durch innere oder äußere Blutungen ausgelöst (Herold 2007). Häufige Ursachen dieser Blutungen sind Unfälle, Stichverletzungen, gastrointestinale Blutungen, Aortenaneurysmen oder gynäkologische Blutungsquellen. Besonders in der Altersgruppe der 15 bis 44 Jährigen steht ein großer Anteil der Todesfälle in Verbindung mit einem hämorrhagischen Schock (Kauvar, Lefering et al. 2006). Dafür ist vor allem eine hohe Zahl an Unfallopfern aus Risikosportarten, wie z.B. Motorradfahren, die in dieser Altersgruppe sehr beliebt sind, verantwortlich. Klinisch wird der hämorrhagische Schock in vier verschiedene Schwerestufen unterteilt. Diese reichen von leichten Hämorrhagien, die kaum zu schwerwiegenden Beschwerden führen (10-15% Blutverlust, Klasse I), bis hin zum schweren hämorrhagischen Schock mit mehr als 40% Blutverlust (Klasse IV) (Peitzman, Harbrecht et al. 1995). Schockereignisse dieser Klasse sind akut lebensbedrohlich und bedürfen einer unverzüglichen und adäquaten Therapie, da unter diesen Bedingungen alle Organe des Körpers akut geschädigt werden.

### **1.2. Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung durch hämorrhagischen Schock**

Die durch den hämorrhagischen Schock verursachte Gewebeschädigung beruht grundsätzlich auf zwei Mechanismen. Erstens ergibt sich durch den Blutverlust ein Mangel an O<sub>2</sub>-Trägern, der zu einer Minderversorgung der Gewebe mit Sauerstoff führt. Zweitens entsteht durch den starken Flüssigkeitsverlust ein Volumenmangel im Gefäßsystem und dadurch eine verringerte Gewebepерfusion. Beides führt in den Organen zu einer Ischämie (Peitzman, Harbrecht et al. 1995). Durch den O<sub>2</sub>-Mangel wird die ATP-Produktion in den Zellen weitestgehend auf die anaerobe Glykolyse reduziert, die jedoch den Energiebedarf vieler Zellen (z.B. Hepatozyten) nicht decken kann (De Groot 2005). In dieser für die Zellen kritischen Situation werden vermehrt

Enzyme (Xanthinoxidase, induzierbare NO-Synthase (iNOS)) aktiviert, die während der Reoxygenierung an der Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO^{\cdot}$ ) beteiligt sind (Hierholzer und Billiar 2001). Auch können reduzierte chelatisierbare Eisenionen mit  $H_2O_2$  zu hochreaktiven Hydroxylradikalen reagieren (Fentonreaktion, siehe 4.3.4.), die ein hohes zellschädigendes Potential besitzen (Kehrer 2000). Die oben genannte iNOS spielt zudem eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Inflammation nach hämorrhagischem Schock, infolge dessen es zu einem nekrotischen und apoptotischen Zelluntergang kommt, der letztlich zur Permeabilität von Gefäßepithelien (Hämorrhagien in den Organen) und Gewebenekrosen (z.B. Zerstörung des Dünndarmepithels) führt. Diese Ereignisse führen nicht selten zu Komplikationen wie Sepsis und/oder multiplem Organversagen, bei denen eine sehr hohe Mortalität gegeben ist (Angele, Schneider et al. 2008).

### **1.3. Klinische Therapie des hämorrhagischen Schocks**

Die Therapie des hämorrhagischen Schocks besteht zunächst im Stillen der Blutung. Darüber hinaus erfolgt eine Volumensubstitution, die zum einen den Blutdruck dauerhaft stabilisieren, zum anderen aber auch die  $O_2$ -Versorgung der Gewebe sichern und die Organschädigung minimieren soll (Hußmann, Taeger et al. 2011). Wegen der Sauerstofftransportfähigkeit, aber auch wegen der im Blut enthaltenen immunmodulatorischen Zellen, ist hierbei immer eine Therapie mit Blutkonserven, die durch andere Infusionslösungen ergänzt wird, anzustreben (Kaur, Basu et al. 2011). Da Blutkonserven zur Erstversorgung in Notfallsituationen meist nicht verfügbar sind, werden häufig physiologische kristalloide Elektrolytlösungen über großlumige Venenkatheter infundiert (Pfenninger, Nicolai et al. 2010). Eine der gebräuchlichsten und bestuntersuchten kristalloiden Infusionslösungen ist die Ringer-Laktat-Lösung (Angele, Schneider et al. 2008). Sie soll durch eine laktatbedingte Alkalisierung einer durch den hämorrhagischen Schock verursachten Azidose entgegenwirken (Matsuda, Sakurai, et al. 1994). Jedoch ist für Laktat auch eine Hemmung der Glykolyse beschrieben (Robergs, Ghiasvand, et al. 2004), die die ohnehin schon kritische Energieversorgung der Zellen im hämorrhagischen Schock noch verschlimmern könnte. Für Ringer-Lösung ohne Laktat, die ebenfalls eingesetzt wird,

ist zwar keine alkalisierende Wirkung beschrieben, jedoch kann bei ihrem Einsatz auch eine Hemmung der Glykolyse durch Laktat ausgeschlossen werden. Für die rein kristalloiden Lösungen gilt allgemein, dass sie den Blutdruck nur relativ kurzfristig stabilisieren können, da sie sich im gesamten Extrazellarraum verteilen und nur teilweise intravasal verbleiben. Anders als Blutkonserven tragen sie selbst aufgrund ihrer geringen O<sub>2</sub>-Transportfähigkeit auch nicht direkt zur O<sub>2</sub>-Versorgung der Gewebe bei, sondern können nur über eine Stabilisierung des Blutdrucks die Mikrozirkulation und somit die Oxygenierung in den Geweben verbessern. Trotzdem werden sie häufig eingesetzt, da sie kaum inflammatorisch wirken und nur wenige Nebenwirkungen besitzen (Angele, Schneider et al. 2008). Neben den kristalloiden Lösungen sind auch verschiedene kolloidale Infusionslösungen (Lösungen mit onkotisch wirksamen Makromolekülen wie z.B. Hydroxyethylstärke) in Gebrauch, die eine nachhaltigere Volumensubstitution als die kristalloiden Lösungen ermöglichen. Dieser Effekt beruht auf den onkotischen Eigenschaften der verwendeten Makromoleküle, die dem Austritt der Lösung aus dem intravasalen Raum entgegenwirken. Jedoch treten beim Einsatz der kolloidalen Lösungen proinflammatorische und anaphylaktische Nebenwirkungen auf (Wagner und D'Amelio 1993). Basierend auf einer Auswertung von 55 Studien bewirkt der Einsatz von kolloidalen Lösungen im Vergleich mit kristalloiden Lösungen keine nachweisbare Verbesserung der Überlebensrate, weswegen aktuell dazu geraten wird, die deutlich kostengünstigeren kristalloiden Lösungen zu verwenden (Perel und Roberts 2007). Im Einzelfall hängt die Wahl des Volumensubstitutionsregimes sowohl von der Verfügbarkeit von Blutkonserven, aber auch von den Erfahrungen des behandelnden Arztes ab. Bis dato existiert keine Infusionslösung, die gleichzeitig die O<sub>2</sub>-Versorgung verbessert, den Kreislauf nachhaltig stabilisiert, zu wenigen/keinen Nebenwirkungen führt und idealerweise in Notfallsituationen standardmäßig verfügbar ist.

#### **1.4. Tiermodelle des hämorrhagischen Schocks**

In der Literatur finden sich verschiedenste Tiermodelle für Untersuchungen unterschiedlicher Fragestellungen zum hämorrhagischen Schock (Majde 2003; Lomas-Niera, Perl et al. 2005; Mochhala, Wu et al. 2009). Es wird vor allem in

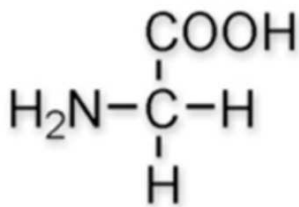
volumenbasierte („fixed volume“) und blutdruckbasierte („fixed pressure“) Modelle unterschieden (Moochhala, Wu et al. 2009). Bei den volumenbasierten Modellen wird den Tieren ein festgelegtes, vom Körpergewicht abhängiges, Blutvolumen zur Einleitung des hämorrhagischen Schocks abgenommen. Demgegenüber richtet sich die abzunehmende Blutmenge bei den blutdruckbasierten Modellen nach einem bestimmten im Schock zu erreichenden Zielblutdruck. Ein Nachteil volumenbasierter Modelle ist, dass das Körpergewicht von Säugetieren nicht exakt linear mit dem Blutvolumen korreliert. Schwerere Tiere besitzen häufig einen höheren Fettgewebeanteil, der verhältnismäßig wenig vaskularisiert und somit durchblutet ist. Dadurch kann es bei volumenbasierten Modellen zu interindividuellen Blutdruckunterschieden im Schock und somit zu variablen Schockintensitäten kommen, die sich negativ auf die Reproduzierbarkeit der Versuche auswirken können (Gainer, Lipa et al. 1995). Dieses Problem besteht bei blutdruckbasierten Modellen nicht. In den bisher existierenden blutdruckbasierten Modellen wurden allerdings Versuchsprotokolle verwendet, die entweder nicht klinisch relevant und/oder reproduzierbar genug waren, oder keine lebensbedrohliche Organschädigung verursachten. So wird der Blutdruck in vielen Modellen auf 35 mmHg oder noch höher eingestellt (Halvorsen, Gunther et al. 1991; Greiffenstein, Mathis et al. 2007; Molina, Whitaker et al. 2009), was bei einer klinisch relevanten Schockdauer von 45-60 Minuten (Hußmann, Taeger, et al. 2011) nur zu marginalen Gewebeschädigungen führt (nicht publizierte eigene Vorversuche; Rönn, Petrat, de Groot 2010). In anderen Modellen hingegen ist die Schockdauer unrealistisch kurz (Stein, Hinder et al. 1990; Chang und Varma 1992; Eser, Kalkan et al. 2007) oder lang (Halvorsen, Gunther et al. 1991; Sato, Tanaka et al. 2010), oder es wird keine therapeutische Volumensubstitution durchgeführt (Sato, Tanaka et al. 2010), was Untersuchungen zu verschiedenen Volumensubstitutionsregimen ausschließt.

### **1.5. Potentielle Schutzstoffe zur Gewebeprotektion im hämorrhagischen Schock**

Bislang sind zahlreiche Schutzstoffe beschrieben worden, die die unter 1.2. genannten Schädigungsmechanismen im hämorrhagischen Schock verhindern oder zumindest abschwächen sollen. Diese Substanzen werden allerdings bisher nicht zur

standardmäßigen klinischen Behandlung des hämorrhagischen Schocks verwendet. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Stoffe (Glycin, Pyruvat, Resveratrol, Deferoxamin und LK 614) haben ihre gewebeprotective Wirksamkeit bereits in anderen Ischämie/Reperusionsmodellen oder Schockmodellen (siehe 1.5.1.-1.5.4.) unter Beweis gestellt. Daher ist es nahe liegend, sie auch im schweren hämorrhagischen Schock einzusetzen und ihr protektives Potential vergleichend zu untersuchen.

### 1.5.1. Glycin

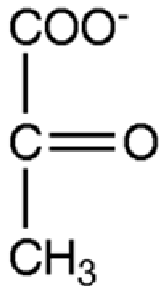


**Abb. 1:** Strukturformel von Glycin (verändert nach uni-protokolle.de, Stand: 19.04.2012).

Glycin ist die am einfachsten aufgebaute Aminosäure. Sie besteht lediglich aus einer Aminogruppe, einer Carboxylgruppe und zwei Wasserstoffatomen, die alle an ein zentrales Kohlenstoffatom gebunden sind (Abb. 1). Bekannt ist Glycin vor allem als der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn. Zusätzlich wurden für Glycin in zahlreichen Publikationen zytoprotektive Effekte (siehe 4.3.1.) in Sauerstoff- und Energiemangelsituationen beschrieben (Jacob, Ascher et al. 2003; Gundersen, Vaagenes et al. 2005). Zum Beispiel konnten Jacob et al. in einem Rattenmodell der mesenterialen Ischämie/Reperfusion zeigen, dass durch Glycin die Produktion der proapoptotischen Signalstoffe bax und Caspase-3 deutlich reduziert werden konnten (Jacob, Ascher et al. 2003). Weitere Effekte des Glycins, die für die Behandlung des hämorrhagischen Schocks sehr interessant sind, sind die Verminderung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und des intrazellulären Kalziumgehalts (siehe 4.3.1.), die die vielfach beschriebenen antiinflammatorischen Wirkungen bedingen können (Zhong, Wheeler et al. 2003). Diese positiven Eigenschaften des Glycins wurden auch bereits, bezogen auf die Protektion verschiedener lebenswichtiger Organe, beschrieben (Petrat, Boengler et al. 2011). In vitro konnte von Nagatomi et al. gezeigt werden, dass Glycin die Sterblichkeit von kultivierten Hepatozyten während einer Hypoxie deutlich reduzierte (Nagatomi, Sakaida et al. 1997). In einem Modell des hämorrhagischen Schocks der Ratte

konnten Mauriz et al. eine histologisch sichtbare Protektion der Leber sowie eine signifikante Verminderung der Transaminasenfreisetzung durch Glycin zeigen (Nagatomi, Sakaida et al. 1997; Mauriz, Matilla et al. 2001). Für die Nieren von Ratten konnten bereits zytoprotektive Effekte des Glycins während einer durch Zyklosporin A verursachten Hypoxie beobachtet werden (Sogabe, Roeser et al. 1996; Zhong, Arteel et al. 1998). Auch für den Dünndarm wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von Glycin in Modellen der mesenterialen Ischämie/Reperfusion die Schädigung der Dünndarmzotten reduziert, sowie die Kontraktilität der Dünndarmmuskulatur verbessert wird (Kallakuri, Ascher et al. 2003; Petrat, Drowatzky et al. 2011). Auch Untersuchungen im hämorrhagischen Schock zeigten erfolgversprechende Ergebnisse. So konnten Zhong et al. zeigen, dass Glycin in einem Rattenmodell des hämorrhagischen Schocks die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies signifikant reduzierte (Zhong, Enomoto et al. 1999; Mauriz, Matilla et al. 2001; Wang, Zhao et al. 2004). In den hier beschriebenen Modellen des hämorrhagischen Schocks wurde der Blutdruck der Versuchstiere während des Schocks auf 30-40 mmHg eingestellt, weshalb sie nicht die Verhältnisse eines lebensbedrohlich schweren hämorrhagischen Schocks widerspiegeln, wie er in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Deshalb war es notwendig, Glycin erneut auf seine Wirksamkeit im vorliegenden Modell zu überprüfen. Auf die Mechanismen der erwähnten Schutzwirkungen wird unter 4.3.1. näher eingegangen.

### 1.5.2. Pyruvat

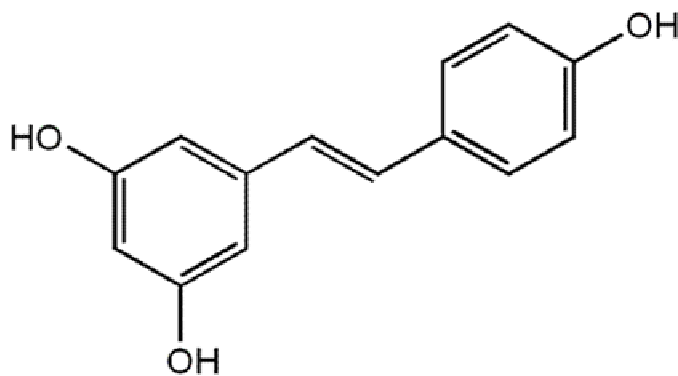


**Abb. 2:** Strukturformel von Pyruvat (verändert nach wikipedia.de, Stand: 19.04.2012).

Pyruvat, das Anion der Brenztraubensäure, ist als Produkt der aeroben Glykolyse ein zentrales Intermediat des Zellmetabolismus (Abb. 2). Es zeigte protektive Effekte in verschiedensten experimentellen Ansätzen. Insbesondere für die Schädigung durch Ischämie und Reperfusion sind mehrere Schutzmechanismen bekannt. Die wichtigsten der bisher beschriebenen Mechanismen, die einen Schutzeffekt hinsichtlich der unter 1.2 beschriebenen Schädigungsmechanismen versprechen, sind: a) das Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere von Peroxiden, b) eine indirekte antioxidative Wirkung durch die Regeneration von NADPH als Energieäquivalent (Elektronendonator für Glutathion), c) eine verbesserte Versorgung der Mitochondrien mit Energieäquivalenten sowie d) eine Absenkung des cytosolischen Redoxpotentials (Mongan, Karaian et al. 2003). Während der therapeutischen Volumensubstitution nach hämorrhagischem Schock wurde in Tierversuchen neben Natrium-Pyruvat vor allem das Pyruvatderivat Ethyl-Pyruvat eingesetzt. Ethyl-Pyruvat soll eine sehr hohe Stabilität in wässriger Lösung besitzen und deshalb besser zum Einsatz als Infusionslösung geeignet sein (Fink 2002; Tawadrous, Delude et al. 2002). Natrium-Pyruvat gewährleistet allerdings eine bessere Protektion im hämorrhagischen Schock (Sharma und Mongan 2010). Darüber hinaus soll sich nach neuesten Forschungsergebnissen Ethyl-Pyruvat negativ auf die Regeneration der Leber nach Intoxikation mit einer Überdosis Paracetamol auswirken (Yang, Zou et al. 2012). Nach Einschätzung von Fink (Fink 2002) kondensiert Natrium-Pyruvat jedoch in wässriger Lösung schnell zu Parapyruvat, das im Verdacht steht, den Citratzyklus zu hemmen. Natrium-Pyruvat zeigte seine Wirksamkeit in Tiermodellen zum hämorrhagischen Schock bisher u.a. durch die Reduzierung der zellulären Apoptose in der Leber (Mongan, Capacchione et al. 2002) und Lunge (Koustova, Rhee et al. 2003) sowie anhand der Verbesserung

des Gehirn-Cortex-Metabolismus und dessen Funktionalität (Mongan, Capacchione et al. 2001). Außerdem konnte in einem Schweinemodell des hämorrhagischen Schocks durch die Verabreichung von Natrium-Pyruvat eine verlängerte Überlebenszeit beobachtet werden (Mongan, Fontana et al. 1999). In den hier beschriebenen Modellen des hämorrhagischen Schocks wurde der Blutdruck der Versuchstiere während des Schocks jedoch auf 30-40 mmHg eingestellt, weshalb sie nicht die Verhältnisse eines lebensbedrohlich schweren hämorrhagischen Schocks widerspiegeln, wie er in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Deshalb war es notwendig, Pyruvat erneut auf seine Wirksamkeit im vorliegenden Modell zu überprüfen.

### 1.5.3. Resveratrol



**Abb. 3:** Strukturformel von Resveratrol (nach reformhaus-fachlexikon.de, Stand: 19.04.2012).

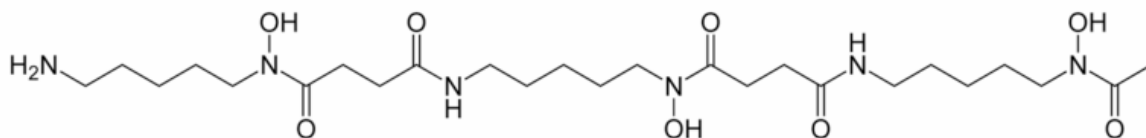
Resveratrol ist ein niedermolekulares Phytoalexin (Abb. 3), das laut Literaturangaben eine antioxidative Wirkung besitzt (Frémont 2000). Es kommt unter anderem in Weintrauben, Himbeeren, Pflaumen und Erdnüssen vor und dient den Pflanzen zur Abwehr von Bakterien- oder Pilzinfektionen. Im letzten Jahrzehnt wurden viele positive pharmakologische Eigenschaften dieses Stoffes entdeckt. Hierbei reicht das Spektrum von der Abtötung von Krebszellen (Fulda 2010) über positive Effekte bei der Alzheimer-Krankheit (Vingtdeux, Dreses-Werringloer et al. 2008; Karuppagounder, Pinto et al. 2009) bis hin zur Behandlung von Multipler Sklerose (Shindler, Ventura et al. 2010). Auch für Ischämie/Reperfusionseignisse sind bereits Schutzeffekte nachgewiesen. So zeigte Resveratrol antiapoptotische, vasorelaxatorische und endotheliumprotektive Eigenschaften in kardiovaskulären Ischämie/Reperfusionssituationen (Das und Das 2007; Saiko, Szakmary et al. 2008). In der Leber wurde nach Ischämie/Reperfusion eine deutliche Erhöhung



antioxidativer Enzyme (siehe 4.3.3.) durch Resveratrol nachgewiesen (Gedik, Girgin et al. 2008; Hassan-Khabbar, Cottart et al. 2008). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Resveratrol das ischämische Gehirn durch eine Erhöhung der Sirtuin-1 Aktivität und die daraus resultierende Neuroprotektion schützt (Raval, Lin et al. 2008; Della-Morte, Dave et al. 2009). Außerdem konnte in Ratten durch die Applikation von Resveratrol eine deutliche Verringerung der Dünndarmschädigung (makroskopischer Score, Myeloperoxidaseaktivität und Blutgehalt im Gewebe) nach mesenterialer Ischämie und Reperfusion erzielt werden (Petrat und de Groot 2011). Auch für den Einsatz von Resveratrol im hämorrhagischen Schock gibt es bereits vielversprechende Ergebnisse. So soll Resveratrol im hämorrhagischen Schock der Ratte die Leber über die Inhibition von proinflammatorischen Mediatoren (u.a. IL-6, CINC 1, CINC 3) schützen (Yu, Hsu et al. 2008). Die postulierten Mechanismen der Schutzeffekte durch Resveratrol sind sehr komplex; die Wichtigsten werden unter 4.3.3. näher erläutert.

#### 1.5.4. Eisenchelatoren

##### 1.5.4.1. Deferoxamin



**Abb. 4:** Strukturformel von Deferoxamin (nach de.academic.ru, Stand: 19.04.2012).

Deferoxamin (Desferal®) ist aufgrund seines hohen Molekulargewichtes und seiner Hydrophilie (Abb. 4) ein vor allem extrazellulär wirksamer Eisenchelator, der klinisch zur Verringerung des Gehalts von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen im Blut (unter anderem bei multitransfundierte Patienten) genutzt wird. Die durch Deferoxamin komplexierten Eisenionen werden mit dem Urin ausgeschieden. Seine Affinität für chelatisierbare  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen ist deutlich höher als für  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen. Chelatisierbare, redoxaktive Eisenionen katalysieren die ohne sie äußerst langsam ablaufende Fenton-Reaktion, bei der aus der Reaktion von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  Hydroxylradikale resultieren. Durch die Chelatisierung der  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen, die bei der Fentonreaktion aus den  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen entstehen, wird deren erneute Reduktion zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen („Redoxcycling“) verhindert und somit weitere Fenton-Reaktionen unterbunden. Zudem stehen  $\text{Fe}^{3+}$ -

Ionen und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in einem Gleichgewichtsverhältnis zueinander, so dass durch die Chelatisierung der  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen letztlich alle Fe-Ionen komplexiert werden können und somit die Produktion des hochreaktiven Hydroxylradikals, das oxidative Schäden an Biomolekülen wie Membranlipiden und der DNA verursacht, verhindert wird. Somit spielt Deferoxamin eine wichtige Rolle als Antioxidans in Ischämie/Reperfusionssituationen, in denen vermehrt  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet werden kann (siehe Petrat, Swoboda et al. 2010). In diesem Zusammenhang wurden bereits partielle Schutzeffekte für Modelle der Dünndarmischämie beschrieben (Lelli Jr, Pradhan et al. 1993; Petrat, Swoboda et al. 2010). In Kombination mit verschiedenen kolloidalen Volumensubstitutionslösungen hat Deferoxamin auch schon seine Wirksamkeit im hämorrhagischen Schock gezeigt. So wurde von Rana et al. in einem Rattenmodell (90 Minuten Schock bei 40 mmHg) eine deutlich verbesserte Leberfunktion durch Deferoxamin kombiniert mit Hespan nachgewiesen (Rana, Shapiro et al. 2002). Darüber hinaus konnten Rose et al. zeigen, dass durch eine Kombination von Hydroxyethylstärke und Deferoxamin als Volumensubstitutionslösung nach hämorrhagischem Schock der Ratte (60 Minuten bei 40 mmHg) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Hepatozyten und ihre oxidative Schädigung verhindert wird (Rose, Pizanis et al. 2000).

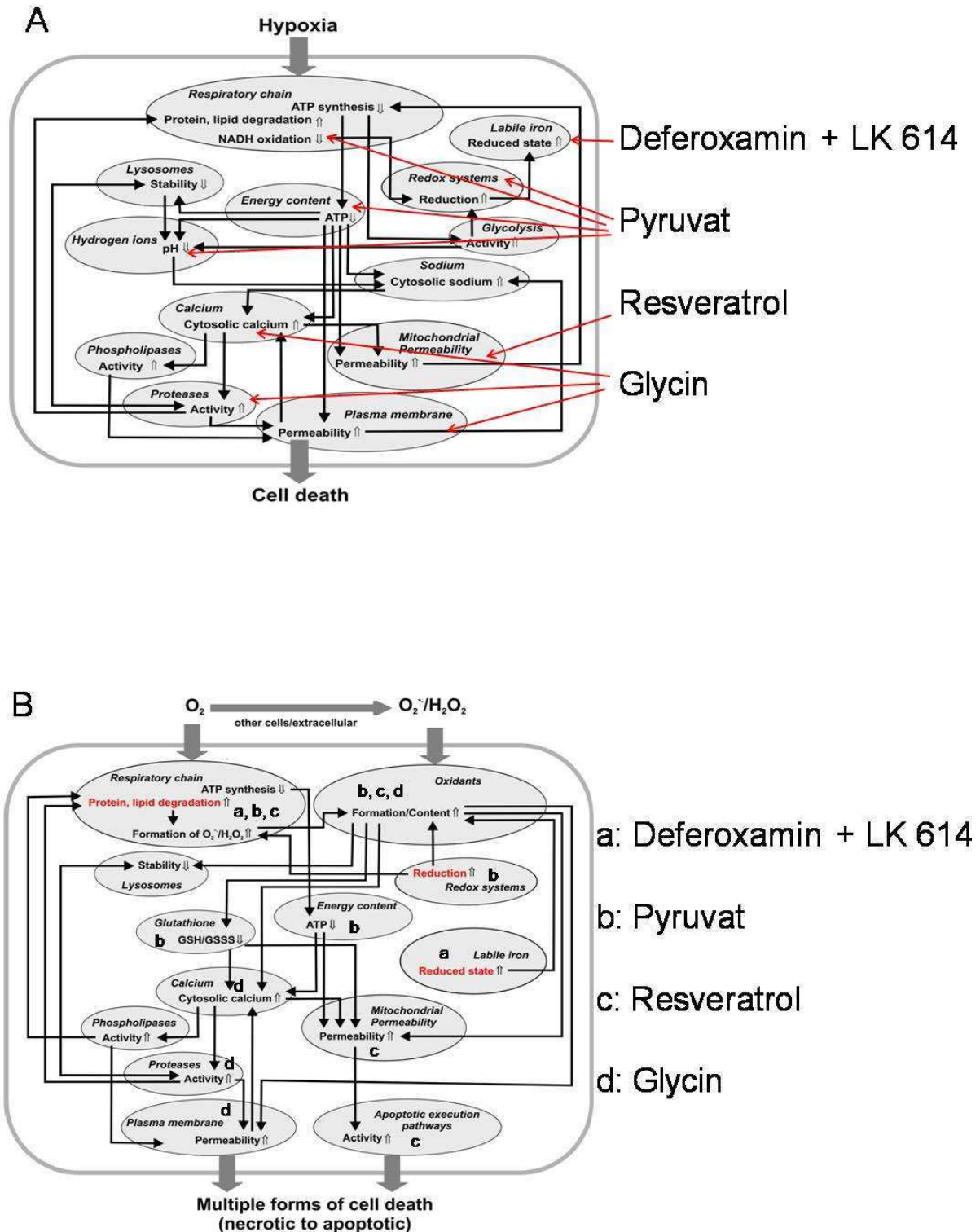
#### **1.5.4.2. LK 614**

LK 614 ist ein relativ neuartiges, kleines und lipophiles (und daher gut membrangängiges) Hydroxamsäurederivat. Es wurde von der Dr. Köhler Chemie GmbH in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen entwickelt, um Eisenionen intrazellulär zu chelatisieren. In bisher unveröffentlichten Untersuchungen am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen zeigte LK 614 bereits in deutlich geringeren Dosen als Deferoxamin eine protektive Wirkung hinsichtlich der Schädigung des Dünndarms durch Ischämie und Reperfusion. Ebenso konnte im Rattenmodell für LK 614 bereits eine schützende Wirkung auf die, für die Transplantation vorgesehenen Herzen (Koch, Loganathan et al. 2010) und Lebern (Wu, Wohlschlaeger et al. 2009) während deren Kalltlagerung belegt werden. Derzeit läuft eine klinische Studie zum Einsatz einer kardioplegischen Lösung, die Deferoxamin und LK 614 enthält. In Anlehnung

an diese Studie wurden Deferoxamin und LK 614 in der vorliegenden Arbeit miteinander kombiniert eingesetzt (siehe auch 4.3.4.). Im hämorrhagischen Schock wurde LK 614 bisher noch nicht eingesetzt.

## **1.6. Potentielle synergistische Effekte durch Kombinationen von Schutzstoffen**

Die durch den hämorrhagischen Schock (v.a. die Ischämie, siehe 1.2.) verursachten Zellschädigungen beruhen nicht auf einem isolierten Schädigungsmechanismus, sondern sind das Resultat verschiedener Schädigungswege (Abb. 5). Es handelt sich hierbei um pathogenetische Netzwerke, deren einzelne Schädigungsmechanismen sich gegenseitig beeinflussen (z.B. verstärken) und gemeinsam eine Gesamtschädigung bedingen (De Groot 2005). Es ist daher unzureichend, durch einen Schutzstoff nur einen Schädigungsmechanismus zu inhibieren. Die irreversible Schädigung von Zellen und Geweben würde letztlich durch andere parallele Schädigungsmechanismen des pathogenetischen Netzwerks verursacht. Es ist daher sinnvoll, möglichst viele Schädigungswege gleichzeitig zu unterbinden. Um für die Gewebeprotektion nach einem hämorrhagischen Schock ein möglichst breites Spektrum der Schädigungsmechanismen abzudecken, sollte es daher effektiver sein, die unterschiedlichen protektiven Eigenschaften verschiedener Schutzstoffe miteinander zu kombinieren. Da die protektiven Effekte der unter 1.5. beschriebenen Schutzstoffe höchstwahrscheinlich auf verschiedenen Mechanismen beruhen, ist zu erwarten, dass sich bei ihrer Kombination synergistische Schutzeffekte zeigen. In der Literatur ist bisher kein Einsatz von derartigen Kombinationslösungen beschrieben.



**Abb.5:** Einfluss der Schutzstoffe Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Deferoxamin + LK 614 auf das pathogentische Netzwerk der Zellschädigung durch A) Hypoxie und B) Reperfusion. (verändert nach de Groot (2005))

## 1.7. Problemstellung und Ziele der Arbeit

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt darauf herauszufinden, ob und wie effektiv Glycin, Pyruvat, Resveratrol, Deferoxamin und LK 614 im schweren hämorrhagischen Schock der Ratte schützend wirken. Weiterführend sollten die vielversprechendsten Schutzstoffe miteinander kombiniert werden, um so synergistische Effekte zu nutzen. Die in diesen Versuchsserien protektivsten Substanzen oder Kombinationen sollen einen wichtigen Beitrag zur Erstbehandlung des hämorrhagischen Schocks in Notfallsituationen leisten.

Zuerst sollte an der Ratte ein Tiermodell etabliert werden, das einen möglichst schweren hämorrhagischen Schock und die nachfolgenden Volumensubstitutions- und Beobachtungsphasen simuliert.

Das Tiermodell sollte folgende Kriterien erfüllen:

- Möglichst intensiver Schock, um
  1. therapeutische Maßnahmen stellvertretend für einen lebensbedrohlichen Schockzustand des Menschen untersuchen zu können.
  2. eine möglichst ausgeprägte Organschädigung zu erzielen, an der sich mögliche Schutzeffekte bestmöglich abbilden lassen.
  3. die Effektivität von Therapieansätzen auf die Überlebenszeit nach dem Schock untersuchen zu können.
- Möglichst hohe Reproduzierbarkeit des Modells.
- Möglichst hohe klinische Relevanz durch die Wahl einer realistischen Schockdauer und Intensität sowie einem realitätsnahen Volumensubstitutionsregime.
- Vermeidung methodischer Artefakte im Tiermodell.

Nach der Etablierung des Modells sollten Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung jeweils als reine Lösung oder begleitet von einer Eigenbluttransfusion zur Volumensubstitution eingesetzt werden. Diese Versuche zielen auf die Detektion

einer geeigneten Trägerlösung für die nachfolgend untersuchten Schutzstoffe ab. Obwohl Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung klinisch bereits seit langem eingesetzt werden, ist für den schweren hämorrhagischen Schock bisher noch nicht untersucht worden, welche der Lösungen zur therapeutischen Volumensubstitution geeigneter ist.

Unter Verwendung der geeigneteren Lösung sollten anschließend die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol sowie der Eisenchelatoren Deferoxamin und LK 614 auf ihr protektives, therapeutisches Potential hinsichtlich der Folgen des schweren hämorrhagischen Schocks und der Volumensubstitution untersucht werden.

Abschließend sollten die Substanzen mit den besten Schutzeffekten miteinander kombiniert und diese Kombinationen im selben Tiermodell auf mögliche synergistische Schutzwirkungen hin untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Pharmaka und Chemikalien

Hersteller	Produkt (Handelsname)
Abbott GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland)	Isofluran: Forene <sup>®</sup> 100% (V/V)
AstraZeneca GmbH (Wedel, Deutschland)	Xylocain <sup>®</sup> 1%
B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)	Aqua; Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%
Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)
CEVA Tiergesundheit GmbH (Düsseldorf, Deutschland)	Ketamin 10%
DiasysDiagnostic Systems GmbH (Holzheim, Deutschland)	ALAT(GPT) FS (IFCC mod.); ASAT(GOT) FS (IFCC mod.); CK-NAC FS; Creatinine FS; LDH FS IFCC

Fenwal, Inc. (Lake Zurich, IL, USA)	Acid-Citrat-Dextrose-A (ACDA)
Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg v.d.H., Deutschland)	Ringerlösung (R); Ringer-Lactat-Lösung (RL)
Hospira Deutschland GmbH (München, Deutschland)	Deferoxaminmesilat Hospira 100 mg/ml
Dr. Franz Köhler Chemie GmbH (Bensheim, Deutschland)	LK 614
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)	Formalin solution, neutral buffered 10%; Resveratrol; Sodium pyruvate (approx. 99% GC)

### 2.1.2. Verbrauchsmaterial, Hilfsmittel und Geräte

Hersteller	Produkt
ASMUTH Medizintechnik GmbH (Minden, Deutschland)	Medizinische Temperatursonde D-RB3
B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)	Perfusor Secura FT; Infusionsgerät, Intrafix Primeline; Original-Perfusor®-Spritze OPS 50 ml;
Drägerwerk AG	Narkosegerät Trajan 800;



(Lübeck, Deutschland)	IsofluranVet. Med. Vapor
Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)	Zentrifuge, Biofugeprimo;  Trockenschrank B6760
Impromediform GmbH (Lüdenscheid, Deutschland)	Neonatologischer Blutfilter, 200 µm
Karl Beese GmbH & Co KG (Barsbüttel, Deutschland)	Vliesstoffkompressen
Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)	Feinwaage 770
Medax GmbH & Co KG (Rendsburg, Deutschland)	beheizbarer Kleintier OP-Tisch
Medex Medical Ltd (Rossendale, England)	Druckwandler logical MX960
mediPlac GmbH (Borchen, Deutschland)	Druckmanschette
Midmark (Orchard Park, NY, USA)	Narkosegasabsaugung
Nellcor (Boulder, CO, USA)	Pulsoximetriesensor
Radiometer Medical ApS (Brønshøj, Dänemark)	Arterial Blood Sampler, 2 ml, 80 IU Heparine;  Blutgasanalysegerät ABL 715

RESORBA (Nürnberg, Deutschland)	Seide, nicht resorbierbar
Retsch GmbH & CO KG (Haan, Deutschland)	Gewebemühle MM200
Sarstedt AG & CO. (Nümbrecht, Deutschland)	50 ml-Plastikröhren 2 ml-Reaktionsgefäße
Shirley Aldred & CO LTD (Sheffield, England)	Aldasorber für Narkosegase
Siemens Medical Electronics (Danvers, MA, USA)	Biomonitor, Siemens Sirecust 1281
Smiths Medical ASD, Inc. (Keene, NH, USA)	Katheterschlauch aus Polyethylen, ID 0,58 mm OD 0,96 mm
Terumo Europe N.V. (Leuven, Belgien)	2 ml-Spritzen
Varian Medical Systems Inc (Palo Alto, CA, USA)	Photometer, Cary 100 Scan
Vital Scientific N.V. (Dieren, Niederlande)	Clinical Chemistry Analyser, VitalabSelectra E
Zeiss AG (Jena, Deutschland)	Lichtmikroskop

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Die Versuchstiere**

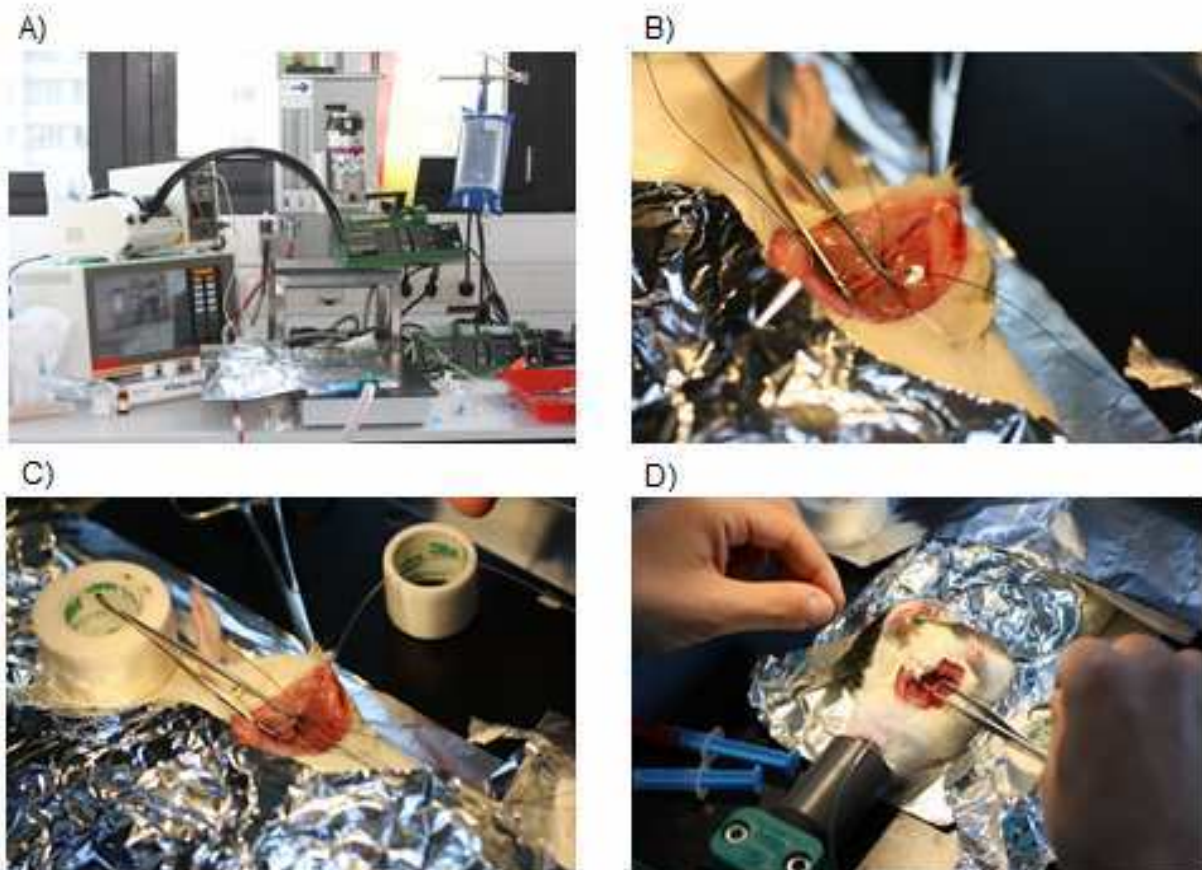
Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um männliche, 400-450 g schwere Wistar Ratten (*Rattus norvegicus*). Die Zucht und Haltung erfolgte im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen (Essen, Deutschland). Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , einer Luftfeuchtigkeit von  $55\% \pm 5\%$  und einem jeweils 12stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie hatten jederzeit freien Zugang zu Futter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Germany) und Wasser. Die Haltung entsprach den geltenden nationalen und internationalen Tierschutzbestimmungen. Alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes NRW (LANUV) genehmigt (TSG-Nr.: G1103/10).

### **2.2.2. Anästhesie, Analgesie und Katheterisierung der Versuchstiere**

Die Narkose der Ratten wurde in einem Begasungstopf mit Isofluran eingeleitet (2 vol. % in 100% medizinischem  $\text{O}_2$  bei 4 L Durchfluss pro Minute). Nach zuverlässiger Narkoseeinleitung wurden die Tiere in Rückenlage auf einen beheizbaren OP-Tisch (Abb. 6A; Plattentemperatur  $37\text{-}40^{\circ}\text{C}$ , je nach Körpertemperatur) und mit der Schnauze an eine mit einem Narkosegerät verbundene Narkosemaske gelegt. Die Isoflurankonzentration wurde von nun an zwischen 1-1,5% bei 1 L Durchfluss pro Minute eingestellt. Über eine subkutane Injektion in die rechte Flanke erhielten die Tiere 50 mg/kg Körpergewicht (KGW) Ketamin zur Analgesie. Zur lokalen Analgesie wurde den Tieren zusätzlich 2,5 mg/kg KGW Lidocain jeweils subkutan in die hintere rechte Leiste und in den Halsbereich injiziert. Bei Wiederauftreten des Lidschluss- und/oder Zwischenzehenreflexes bestand während des gesamten Versuchs die Möglichkeit zur Nachdosierung von Ketamin (40 mg/kg KGW). Dies wurde jedoch bei keiner der verwendeten Ratten notwendig. Die Zunge der Ratten wurde exponiert, mit einem Holzstäbchen fixiert und so gegen einen Verschluss der Atemwege

gesichert. Um ein Auskühlen zu verhindern, wurden die Tiere locker mit Aluminiumfolie bedeckt.

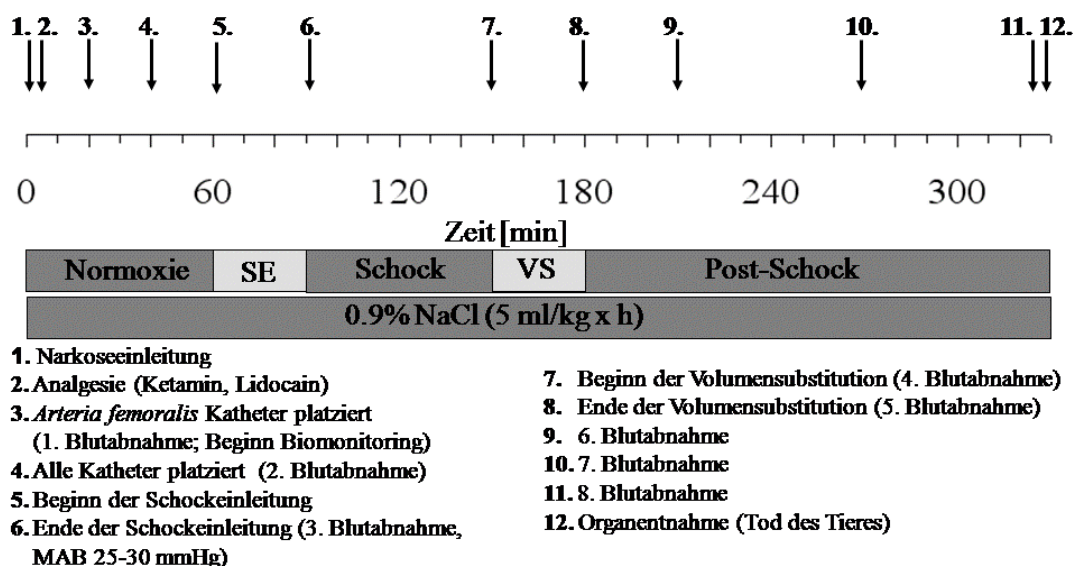
Sobald kein Zwischenzehen- und Lidschlussreflex mehr festzustellen war, erfolgte eine etwa zwei Zentimeter lange Inzision in der rechten Leiste. Die frei liegenden Gefäße *Arteria femoralis* und *Vena femoralis* wurden voneinander separiert und anschließend katheterisiert (Abb. 6B,C). Die Wunde wurde mit feuchten (0,9% NaCl-Lösung) Kompressen gegen Austrocknung geschützt und mit Aluminiumfolie bedeckt. Im Anschluss erfolgten ein ventraler zervikaler Hautschnitt, die Freipräparierung der *Vena jugularis* und deren Katheterisierung (Abb. 6D). Alle Katheter wurden mit chirurgischer Seide an den Gefäßen befestigt.



**Abb. 6:** Operationsplatz und Katheterisierung der Gefäße. A) Übersicht OP-Platz mit Biomonitor (links), Narkosegerät (Hintergrund), beheizbarer OP-Platte (vorne) und zwei Perfusoren (grün). B) Zur Katheterisierung auf einer Pinzette aufgespannte *A. femoralis*. C) Katheterisierte *A. femoralis*. D) Katheterisierung der *V. jugularis*

### 2.2.3. Schockeinleitung, Schock und therapeutische Volumensubstitution

An die Katheterisierung der Gefäße schloss sich eine Adaptationsphase der Tiere von 20 Minuten an (Abb. 7). Der hämorrhagische Schock wurde anschließend durch die Abnahme von jeweils 2 ml Blut in Intervallen von 3 Minuten durch den *A. femoralis*-Katheter eingeleitet. Die Blutabnahmen erfolgten mittels 2 ml-Spritzen, die zuvor mit 0,2 ml Acid-Citrat-Dextrose-A Lösung (ACDA) befüllt worden waren. Die Blutabnahmen wurden fortgesetzt, bis ein mittlerer arterieller Blutdruck (MAB) von 25-30 mmHg erreicht wurde. Dies dauerte üblicherweise ca. 20 Minuten. Während des folgenden Zeitraums, bis zum Erreichen von 30 Minuten nach Schockeinleitungsbeginn, erfolgte die Stabilisierung und Feineinstellung des Blutdrucks in dem angegebenen Bereich durch die Abnahme kleinerer Blutmengen (0,5-1 ml). Das abgenommene Blut wurde in 50 ml Kunststoffröhren bei 37°C gelagert.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Abkürzungen: SE = Schockeinleitung; VS = Volumensubstitution; MAB = Mittlerer arterieller Blutdruck.

Während der folgenden 60 bzw. 45 Minuten (siehe 2.2.5.3.) blieb der MAB konstant bei 25-30 mmHg. In einigen Ausnahmefällen wurden den Tieren zusätzlich kleine Mengen Blut abgenommen (0,1-0,5 ml) bzw. 0,9% NaCl-Lösung (0,1-0,5 ml) zugeführt, um den MAB im angestrebten Bereich zu halten.

Im Anschluss an die Schockphase erfolgte die therapeutische Volumensubstitution über die *V. jugularis* unter Verwendung einer Perfusorpumpe. Über einen Zeitraum von 30 Minuten erhielten die Tiere so versuchsgruppenspezifische Lösungen (siehe 2.2.5.) zur Volumensubstitution. 150 Minuten danach wurden die Versuche beendet (Abb 7). Zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten (Operationswunden, respiratorische Epithelien) und somit zur Stabilisierung des Blutdrucks im Schock erhielten alle Ratten während des gesamten Versuchs eine 0,9% NaCl-Infusion (5 ml/kgxh, 37°C) über die *V. femoralis*.

#### **2.2.4. Euthanasie und Organentnahme**

Am Versuchsende wurde die Isoflurankonzentration auf 5% erhöht. In dieser tiefen letalen Narkose wurden den Tieren der Dünndarm, die Nieren, die Leber, die Lunge und das Herz entnommen und die Ratten somit euthanasiert. Um ihre Entnahme zu erleichtern und mögliche Einblutungen zu verhindern, wurde die Lunge vor der Entnahme über einen Katheter in der Trachea mit Luft gefüllt.

### 2.2.5. Die Versuchsgruppen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier aufeinander aufbauende Versuchsserien durchgeführt (2.2.5.1.-2.2.5.4).

#### 2.2.5.1. Versuchsserie zur Etablierung eines neuen Modells des schweren hämorrhagischen Schocks

Es wurden drei Versuchsgruppen miteinander verglichen.

- **normoxische Kontrollgruppe:** kein Schock, keine therapeutische Volumensubstitution (n = 4).
- **Schock-Ringer-Laktat-Lösung (RL) -Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 60 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem dreifachen Volumen des abgenommenen Blutes in Form von RL (n = 6).
- **Schock-RL + Blut-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 60 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen RL (n = 6).

Unmittelbar vor der therapeutischen Volumensubstitution wurde das abgenommene Blut vorsichtig mit der auf 37°C vorgewärmten RL vermischt. Um zu verhindern, dass eventuelle Mikrokoagel infundiert werden, erfolgte die Volumensubstitution durch einen Blutfilter.

#### 2.2.5.2. Versuchsserie zum Vergleich der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung

Es wurden fünf Versuchsgruppen miteinander verglichen:

- **normoxische Kontrollgruppe:** kein Schock, keine therapeutische Volumensubstitution (n = 6).
- **Schock-Ringer-Lösung (R) -Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 60 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem dreifachen Volumen des abgenommenen Blutes in Form von R (n = 8).
- **Schock-RL-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 60 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem dreifachen Volumen des abgenommenen Blutes in Form von RL (n = 8).
- **Schock-R + Blut-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 60 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R (n = 8).
- **Schock-RL + Blut-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 60 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von RL (n = 8).

#### 2.2.5.3. Versuchsserie zur Protektion durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Deferoxamin/LK 614

In dieser und der unter 2.2.5.4. beschriebenen Versuchsserie betrug die Schockdauer aufgrund einer erhöhten Rattensterblichkeit 45 statt 60 Minuten. Die



Schutzstofflösungen wurden ab dem Beginn der therapeutischen Volumensubstitution über die *V. femoralis* infundiert. In den ersten 15 Minuten der 30-minütigen Volumensubstitution wurden sie mit 10 ml/kgxh infundiert, danach mit 5 ml/kgxh. Anstatt der Schutzstofflösungen erhielten die Tiere der NaCl-Kontrollgruppe 0,9%ige NaCl-Lösung. Alle Ratten erhielten in diesen Serien das abgenommenen ACDA-Blut + das doppelte Volumen in Form von R zur Volumensubstitution. Die Dosierungen der Schutzstoffe sind angelehnt an die protektivsten Dosen aus Versuchen zur mesenterialen Ischämie/Reperfusion (Petrat, Swoboda et al. 2010; Petrat und De Groot 2011; Petrat, Drowatzky et al. 2011; Petrat, Rönn et al. 2011).

Die isoosmotischen Schutzlösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

- **Glycin:** 45 mg Glycin wurden in 13,05 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 1,95 ml H<sub>2</sub>O (Aqua bidest.) gelöst.
- **Resveratrol:** 3 mg Resveratrol wurden in 250 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst.
- **Pyruvat:** 150 mg Natrium-Pyruvat wurden in 5,76 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 9,24 ml H<sub>2</sub>O (Aqua bidest.) gelöst.
- **Deferoxamin + LK 614:** 7,5 mg Desferal<sup>®</sup> und 1,5 mg LK 614 wurden in 15 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst.

Im Anschluss wurde der pH-Wert aller Schutzstofflösungen auf 7,35 eingestellt. Kurz vor Infusionsbeginn wurden alle Lösungen sterilfiltriert.

Es wurden sechs Versuchsgruppen miteinander verglichen:

- **normoxische Kontrollgruppe:** kein Schock, keine therapeutische Volumensubstitution (n = 8).
- **NaCl-Kontrollgruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 0,9%iger NaCl-Lösung (n = 8).

- **Schock-Glycin-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 15 mg/kgxh Glycin (n = 8).
- **Schock-Resveratrol-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 60 µg/kgxh Resveratrol (n = 8).
- **Schock-Pyruvat-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 50 mg/kgxh Natrium-Pyruvat (n = 8).

**Schock-Deferoxamin + LK 614-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 2,5 mg/kgxh Desferal + 0,5 mg/kgxh LK 614 (n = 8).

Der Ablauf der Volumensubstitution entsprach dem unter 2.2.5.1 Beschriebenen (siehe auch Abb. 2).

#### **2.2.5.4. Versuchsserie zur Protektion durch Kombinationen der Einzelschutzstoffe**

Die isoosmotischen Kombinationslösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

- **Eisenchelatoren + Glycin:** 45 mg Glycin, 7,5 mg Desferal® und 1,5 mg LK 614 wurden in 13,05 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 1,95 ml H<sub>2</sub>O (Aqua bidest.) gelöst.
- **Eisenchelatoren + Resveratrol:** 3 mg Resveratrol wurden in 250 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst. Anschließend wurden in 15 ml dieser Lösung 7,5 mg Desferal® und 1,5 mg LK 614 gelöst.
- **Eisenchelatoren + Pyruvat:** 150 mg Natrium-Pyruvat, 7,5 mg Desferal® und 1,5 mg LK 614 wurden in 5,76 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 9,24 ml H<sub>2</sub>O (Aqua bidest.) gelöst.
- **Glycin + Pyruvat:** 45 mg Glycin und 150 mg Natrium-Pyruvat wurden in 3,81 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 11,19 ml H<sub>2</sub>O (Aqua bidest.) gelöst.

Im Anschluss wurde der pH-Wert aller Kombinationslösungen auf 7,35 eingestellt. Kurz vor Infusionsbeginn wurden alle Lösungen sterilfiltriert.

Es wurden sechs Versuchsgruppen miteinander verglichen:

- **normoxische Kontrollgruppe:** kein Schock, keine therapeutische Volumensubstitution (n = 8).
- **NaCl-Kontrollgruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 0,9%iger NaCl-Lösung (n = 8).
- **Schock-Eisenchelatoren + Glycin-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 15 mg/kgxh Glycin + 2,5 mg/kgxh Desferal + 0,5 mg/kgxh LK614 (n = 8).

- **Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 60 µg/kgxh Resveratrol + 2,5 mg/kgxh Desferal + 0,5 mg/kgxh LK 614 (n = 8).
- **Schock-Eisenchelatoren + Pyruvat-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 50 mg/kgxh Natrium-Pyruvat + 2,5 mg/kgxh Desferal + 0,5 mg/kgxh LK 614 (n = 8).
- **Schock-Glycin + Pyruvat-Gruppe:** Hämorrhagischer Schock für 45 Minuten, therapeutische Volumensubstitution mit dem abgenommenen ACDA-Blut + dem doppelten Volumen in Form von R. Infusion von 15 mg/kgxh Glycin + 50 mg/kgxh Natrium-Pyruvat (n = 8).

#### 2.2.6. Biomonitoring

Zur lückenlosen Überwachung des Versuchsverlaufs wurden die wichtigsten Vitalparameter kontinuierlich gemessen und in 10-Minutenintervallen protokolliert:

- Der systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck wurden kontinuierlich über den Katheter in der *A. femoralis* gemessen. Der Katheter war mit einem Druckwandler (Medex Medical Ltd, Rossendale, England) verbunden, der das Blutdrucksignal an einen Monitor weiterleitete. Um den Katheter durchgängig zu halten, wurde dieser kontinuierlich mit 3 ml/h R gespült.
- Die Herzfrequenz wurde anhand der systolischen Blutdruckpeaks bestimmt.
- Zur kontinuierlichen Überwachung der Körpertemperatur wurde den Tieren über die Rektumampulle eine Temperatursonde zwei Zentimeter in den

Enddarm eingeführt. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe des beheizbaren OP-Tisches bei konstant  $37\pm 1^\circ\text{C}$  gehalten.

- Die Atemfrequenz wurde anhand der Atembewegungen pro Minute bestimmt.
- Darüber hinaus wurde an der linken Hinterpfote ein Pulsoximetriesensor zum Monitoring der  $\text{O}_2$ -Sättigung des Blutes angebracht.

### 2.2.7. Blut- und Plasmaparameter

Zu acht festgelegten Zeitpunkten wurden Blutentnahmen mit einem 2 ml Aspirator, der 80 IU elektrolytkompensiertes Heparin enthielt, durchgeführt. Die Blutentnahmen (0,5 ml) erfolgten über den *A. femoralis*-Katheter direkt nach dessen Fixierung im Gefäß, nach Fixierung aller Katheter, am Ende der Schockeinleitung, direkt vor Beginn der therapeutischen Volumensubstitution, nach der Volumensubstitution und 30, 90 und 150 Minuten danach (Abb. 7). Nach jeder Blutentnahme erhielten die Tiere 0,5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung über die *A. femoralis* (Flüssigkeitsausgleich, Freispülen des Katheters).

Der arterielle  $\text{O}_2$ - und  $\text{CO}_2$ -Partialdruck, die  $\text{O}_2$ -Sättigung, der pH-Wert, der Säure-Basen-Status (SBS), die Hämoglobinkonzentration, der Hämatokrit, Elektrolyte ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), metabolische Parameter (Laktat, Glukose) und die Osmolalität des entnommenen Blutes wurden mit einem Blutgasanalysegerät gemessen. Anschließend wurde das restliche Blut zentrifugiert ( $4000 \times g$ , 15 Minuten bei  $25^\circ\text{C}$ ), um das Plasma zu gewinnen, das bis zur weiteren Verwendung (innerhalb von 4 Stunden) bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert wurde. Mit Hilfe eines automatischen Analysegerätes zur Bestimmung klinischer Parameter wurden im Blutplasma die Aktivitäten der Laktatdehydrogenase (LDH; Indikator für allgemeine Zellschädigung), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT; Indikatoren für Leberschädigung), Kreatinkinase (CK; Indikator für Muskelschädigung) und die Konzentration des Kreatinins (Indikator der Nierenfunktion) bestimmt.

Von der letzten Blutprobe am Ende des Tierversuchs wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen (Essen, Deutschland) ein „kleines Blutbild“ angefertigt.

Zudem wurden verschiedene Gerinnungsparameter (Thromboplastinzeit, Fibrinogen und Thrombozyten) gemessen.

#### **2.2.8. Makroskopische Beurteilung der Dünndarmschädigung**

Unmittelbar nach der Entnahme des Dünndarms wurde dieser gewogen und in zehn gleich große Segmente zerteilt, die schnellst möglich und getrennt voneinander in eiskühlten Puffer (140 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4) überführt wurden. Von allen Segmenten wurde nun das Mesenterium entfernt und die Segmente längs an der mesenterialen Seite aufgeschnitten. Im Puffer wurden sie dann mit der luminalen Seite nach oben auf Styroporplatten aufgespannt und anhand eines vierstufigen Scores zur Bewertung der makroskopischen Schädigung des Dünndarms (Petrat, Swoboda et al. 2010) befundet:

**Score 0:** keine sichtbaren Veränderungen

**Score 1:** wenige, vereinzelte Petechien, evtl. mit herdförmiger Verteilung

**Score 3:** leichte lokale Hämorrhagien ohne Verfärbung der Darmwand

**Score 9:** starke Hämorrhagien mit dunkelrot verfärbter Darmwand

Der exponentielle Charakter des Scores gibt das Verhältnis des Hämoglobingehalts der einzelnen Phänotypen wieder. Für jedes Segment wurde der prozentuale Anteil jeder Schädigungsstufe bestimmt. Daraus wurde ein Mittelwert für jedes Segment ermittelt. Die Mittelwerte aller Segmente wurden erneut gemittelt, um so die Gesamtschädigung des Dünndarms zu quantifizieren.

#### **2.2.9. Histopathologische Beurteilung von Organschäden.**

Zur histologischen Beurteilung wurde ein Darmstück (1 cm) jeweils aus dem dritten, fünften und siebten Segment des Dünndarms (Nummerierung vom Duodenum hin zum Ileum), die rechte Niere, der linke Leberlappen, die Lunge und das Herz für 24-48 Stunden in Formalin (10%, neutral gepuffert) fixiert. Die entwässerten und in

Paraffin eingebetteten Präparate wurden 3 µm dick geschnitten und die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Entwässerung, das Ausgießen der Paraffinblöcke und die Färbung wurden am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen (Essen, Deutschland) durchgeführt. In der Versuchsserie zur Modelletablierung wurde keine quantitative Befundung der histologischen Schnitte durchgeführt. Die Schnitte aus Tieren, die einer der Schockgruppen angehörten, wurden jedoch auf qualitative Veränderungen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle hin untersucht.

#### **2.2.9.1. Dünndarm**

Die histopathologischen Veränderungen des Dünndarms wurden mikroskopisch anhand des Chiu/Park-Scores beurteilt (Chiu, McArdle et al. 1970; Park, Haglund et al. 1990):

**Score 0:** ungeschädigte Mukosa

**Score 1:** subepitheliale Gruenhagensche Räume, kapillare Kongestion

**Score 2:** ausgedehnte subepitheliale Räume, leichte Ablösung des Epithels

**Score 3:** starke Ablösung des Epithels an den Aussenseiten der Villi, einige Villispitzen ohne Epithel

**Score 4:** Villi komplett ohne Epithel

**Score 5:** Villi zerstört, Hämorrhagien

**Score 6:** geschädigte Krypten, Hämorrhagien

**Score 7:** Nekrose der gesamten Mukosa und Submukosa, Hämorrhagien

**Score 8:** transmurale Nekrose, Hämorrhagien.

Pro histologischem Schnitt wurden fünf Gesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung beurteilt. Aus dem Mittelwert der Gesichtsfelder der Schnitte eines Segments ergab sich die segmentale Schädigung, während der Mittelwert aller drei Segmente als Maß für die histopathologische Gesamtschädigung des Dünndarms gewertet wurde.

#### 2.2.9.2. Niere

Die histologischen Schnitte der Niere wurden im Hinblick auf acht verschiedene Parameter hin mikroskopisch beurteilt:

**Blutgehalt der Nierenrinde und der Markstrahlen:** Bei 400facher Vergrößerung wurde für den gesamten Rindenbereich der prozentuale Flächenanteil bestimmt, der von Erythrozyten eingenommen wurde.

**Blutgehalt des äußeren Nierenmarks:** Bei 400facher Vergrößerung wurde für den gesamten äußeren Markbereich der prozentuale Flächenanteil bestimmt, der von Erythrozyten eingenommen wurde.

**Blutgehalt des inneren Nierenmarks:** Bei 400facher Vergrößerung wurde für den gesamten inneren Markbereich der prozentuale Flächenanteil bestimmt, der von Erythrozyten eingenommen wurde.

**Erythrozyten in den Glomeruli:** Bei 400facher Vergrößerung wurde der prozentuale Anteil aller Glomeruli bestimmt, in denen sich mehr als 20 Erythrozyten befanden.

**Geschrumpfte Glomeruli:** Bei 100facher Vergrößerung wurde der prozentuale Anteil der geschrumpften Glomeruli bestimmt. Als geschrumpft wurden Glomeruli definiert, die einen deutlichen Abstand zur Bowmanschen Kapsel aufwiesen.

**Abgelöste Basalmembran der Tubuli in der Nierenrinde und den Markstrahlen:** Bei 400facher Vergrößerung wurde der prozentuale Flächenanteil des gesamten Rindenbereichs ermittelt, in dem die Basalmembran der Tubuli abgelöst war.

**Abgelöste Basalmembran der Tubuli im äußeren Nierenmark:** Bei 400facher Vergrößerung wurde der prozentuale Flächenanteil des gesamten äußeren Markbereichs ermittelt, in dem die Basalmembran der Tubuli abgelöst war.



**Abgelöste Basalmembran der Tubuli im inneren Nierenmark:** Bei 400facher Vergrößerung wurde der prozentuale Flächenanteil des gesamten inneren Markbereichs ermittelt, in dem die Basalmembran der Tubuli abgelöst war.

#### 2.2.9.3. Leber

Die histologischen Schnitte der Leber wurden im Hinblick auf drei verschiedene Parameter hin mikroskopisch beurteilt:

**Erythrozyten in den Sinusoiden:** Bei 400facher Vergrößerung wurde für 10 Gesichtsfelder pro Schnitt die jeweilige Anzahl der Erythrozyten in den Sinusoiden gezählt. Aus allen Gesichtsfeldern wurde ein Mittelwert gebildet.

**Entzündliche Granulozyten-Infiltrate:** Bei 400facher Vergrößerung wurden für 10 Gesichtsfelder pro Schnitt die jeweiligen prozentualen Flächenanteile des Leberparenchyms ermittelt, die von Granulozyten eingenommen wurden. Aus allen Gesichtsfeldern wurde ein Mittelwert gebildet.

**Vakuolen im Zytoplasma der Hepatozyten:** Bei 400facher Vergrößerung wurde für 10 Gesichtsfelder pro Schnitt der jeweilige prozentuale Anteil an vakuolisierten Hepatozyten ermittelt. Aus allen Gesichtsfeldern wurde ein Mittelwert gebildet.

#### 2.2.9.4. Lunge

Für die Befundung der Lunge wurden die mittlere Anzahl von Granulozyten pro Gesichtsfeld (10 Gesichtsfelder/Schnitt; 400fache Vergrößerung) sowie der prozentuale Flächenanteil der von Ödemen eingenommen wurde (20 Gesichtsfelder/Schnitt; 100fache Vergrößerung), bestimmt.

#### **2.2.9.5. Herz**

Für die Beurteilung des Herzens wurden die mittlere Anzahl von Granulozyten pro Gesichtsfeld (10 Gesichtsfelder/Schnitt; 400fache Vergrößerung) sowie der prozentuale Flächenanteil der von Ödemen eingenommen wurde (20 Gesichtsfelder/Schnitt; 100fache Vergrößerung), bestimmt.

#### **2.2.10. Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Gewebe des Dünndarms, der Niere, Leber und Lunge**

Nach der makroskopischen Beurteilung des Dünndarms wurden alle zehn Dünndarmsegmente in der Mitte geteilt und die entstandenen 20 Teilstücke jeweils mit 1 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (140 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1 Tablette Proteaseinhibitorcocktail/50 ml, pH 7,4) in 2 ml-Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluss transferiert. Im Anschluss wurden die Darmstücke mittels einer Schere zerkleinert. Kleine Stücke der Niere, Leber und Lunge wurden gewogen und ebenfalls in 1 ml Homogenisierungspuffer zerkleinert. Die Gewebeproben in den Reaktionsgefäßen (versehen mit zusätzlich je einer Mahlkugel) wurden dann mit einer Gewebemühle innerhalb von 15 Minuten bei 30 Schwingungen pro Sekunde homogenisiert. Danach wurde das Gesamtvolumen des Darmhomogenats bestimmt und jeweils 1 ml von jedem Organhomogenat zentrifugiert (16000 x g, 15 Minuten, 25°C). Das freie Hämoglobin in den verdünnten Homogenatüberständen wurde anhand der Absorption der Soret-Bande des Hämoglobins quantifiziert. An einem Photometer wurde dazu das jeweilige Absorptionsmaximum zwischen 400 und 420 nm Wellenlänge bestimmt. Die Absorption des Homogenisierungspuffers diente als Nullwert. Die Werte wurden um die unspezifische Absorption bei 475 nm Wellenlänge korrigiert. Die Hämoglobinkonzentration wurde dann anhand des molaren Extinktionskoeffizienten von Hämoglobin an seinem Soret-Banden-Maximum ( $\epsilon = 131000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) berechnet und in  $\mu\text{mol Hämoglobin/kg KGW}$  für den Dünndarm und  $\mu\text{mol Hämoglobin/g Gewebe}$  für die anderen Organe angegeben.

### **2.2.11. Bestimmung des Lungen- und Dünndarmgewichtes sowie des Nass-Trocken-Gewichtes des Dünndarms**

Zur Bestimmung des Lungen- und des Darmgewichtes wurden die kompletten Organe unmittelbar nach der Organentnahme gewogen. Die Werte wurden in g/kg KGW angegeben. Zur Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichtes des Dünndarms wurde ein 1 cm langes Stück aus dem siebten Segment des Dünndarms verwendet. Dieses wurde aufgeschnitten, von Ingesta befreit und sofort gewogen. Anschließend wurde es bei 60°C für 24 Stunden in einem Trockenschrank getrocknet. Danach wurde es erneut gewogen und die prozentuale Gewichtsabnahme aus der Gewichts Differenz errechnet.

### **2.2.12. Quantifizierung von freiem Hämoglobin im Blutplasma (Hämolyse)**

Von der Volumensubstitutionslösung wurde, falls die Substitution mit Blut erfolgte, jeweils 1 ml vor und nach der Volumensubstitution in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und zentrifugiert (4000 x g, 15 Minuten, 25°C). In dem gewonnenen Überstand wurde zur Ermittlung einer möglichen Hämolyse die LDH-Aktivität bestimmt (siehe 2.2.7.). Wenn die LDH-Aktivität um mehr als 30% höher war als der Ausgangswert (vor der Schockeinleitung) der entsprechenden Ratte, so wurde der Versuch abgebrochen bzw. wurden die Messwerte nicht verwendet. Dieser Fall trat jedoch bei keinem der verwendeten Tiere auf. Zusätzlich wurde im Plasma der letzten Blutabnahme das freie Hämoglobin anhand seiner Soret-Bande bestimmt und die Hämoglobinkonzentration in  $\mu\text{mol/L}$  berechnet, um die durch den hämorrhagischen Schock verursachte Hämolyserate zu erfassen.

### **2.2.13. Statistik**

Die gezeigten Daten sind Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppen  $\pm$  SEM. Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wurde mittels one-way ANOVA und einer Fisher-LSD posthoc-Analyse ermittelt. Ein *P*-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm XLstat 2010 durchgeführt.

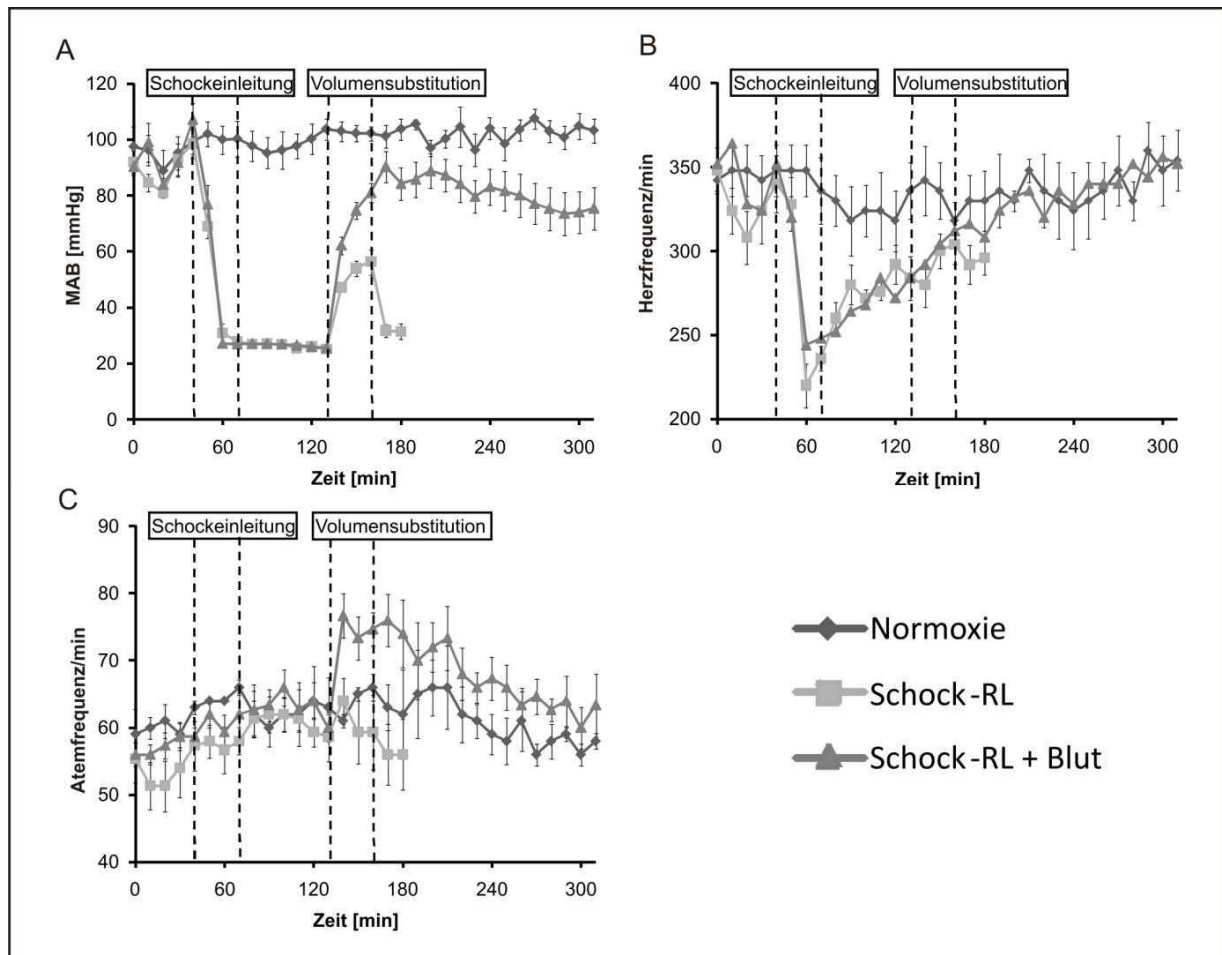
### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Ergebnisse der Versuchsreihe zur Modelletablierung**

Aus den Versuchen zur Modelletablierung ging hervor, dass Tiere, die RL ohne Blut zur therapeutischen Volumensubstitution erhielten, nicht die gesamte Versuchsdauer überlebten. Da dadurch unterschiedlich lange Versuchsverläufe entstanden, sind die Ergebnisse der Organschädigungsparameter dieser Tiere nur eingeschränkt mit denen der Tiere vergleichbar, die Blut zur Volumensubstitution erhielten.

##### **3.1.1. Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks auf die Vitalparameter**

In der normoxischen Kontrollgruppe blieb der MAB während des gesamten Versuchs konstant um 100 mmHg (Abb. 8A). In beiden Schockgruppen wurde der Blutdruck durch die Abnahme von  $29,5 \pm 1$  ml Blut/kg während der Schockeinleitung auf durchschnittlich  $27 \pm 1$  mmHg in der Schockphase abgesenkt. Während der therapeutischen Volumensubstitution stieg der MAB der Schock-RL + Blut-Tiere wieder auf ca. 90 mmHg und nahm bis zum Versuchsende nur leicht ab. Im Gegensatz dazu stieg der MAB in der Schock-RL-Gruppe während der Volumensubstitution nur auf 50-60 mmHg und fiel kurz danach auf  $31 \pm 3$  mmHg ab (Abb. 8A). Kurze Zeit später starben diese Ratten. Der Tod trat durchschnittlich  $70 \pm 20$  Minuten nach der Volumensubstitution ein.



**Abb. 8:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf die Vitalparameter. A) Mittlerer arterieller Blutdruck; B) Herzfrequenz; C) Atemfrequenz. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie:  $n=4$ ; Schock-RL:  $n=6$ ; Schock-RL + Blut:  $n=6$ ). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Kurve der Schock-RL-Gruppe endet mit dem ersten verstorbenen Tier dieser Gruppe. Abkürzungen: MAB = mittlerer arterieller Blutdruck; RL = Ringer-Laktat-Lösung.

Die Herzfrequenz der normoxischen Kontrolltiere blieb während des gesamten Versuchs konstant bei 340 Schlägen pro Minute (Abb. 8B). In den Schockgruppen fiel sie auf ca. 220-250 Schläge pro Minute während der Schockeinleitung und stieg anschließend kontinuierlich an. Die therapeutische Volumensubstitution mit RL + Blut bewirkte einen Anstieg der Herzfrequenz auf den Ausgangswert. Ebenso bewirkte RL als Volumensubstitutionslösung einen Anstieg der Herzfrequenz, jedoch nicht bis auf den Ausgangswert, da die Tiere dieser Versuchsgruppe vorher verstarben (bei ca. 300 Schlägen pro Minute; Abb. 8B).

Die Atemfrequenz der normoxischen Kontrollgruppe lag während des gesamten Versuchs konstant zwischen 55 und 65 Atemzügen pro Minute (Abb. 8C). Während der Volumensubstitution war bei den Schock-RL + Blut-Tieren im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren und der Schock-RL-Gruppe die Atemfrequenz signifikant

erhöht. Im weiteren Versuchsverlauf gab es keinen signifikanten Unterschied der beiden Schockgruppen zur normoxischen Kontrolle (Abb. 8C).

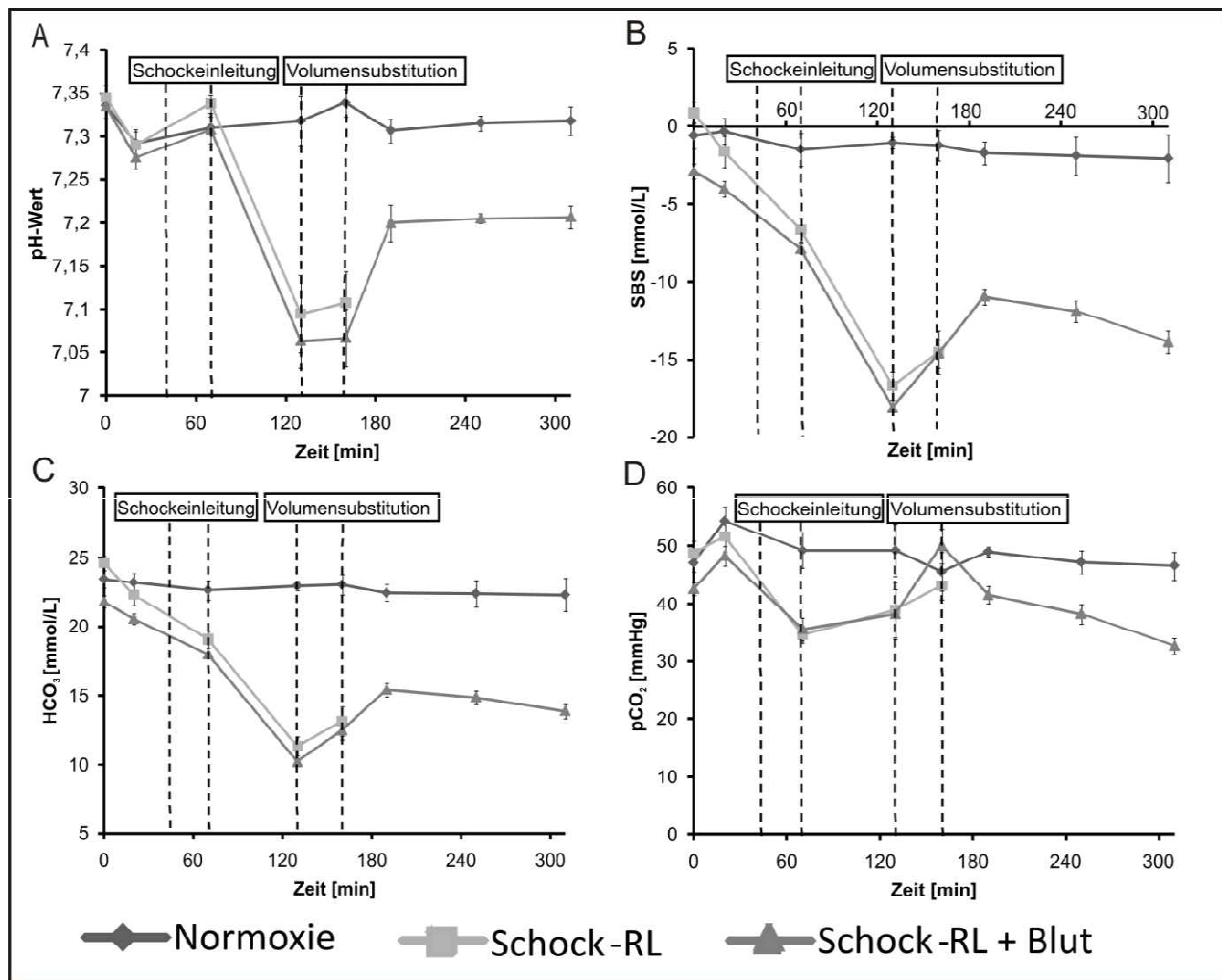
Die Körpertemperatur der normoxischen Kontrolltiere war während des gesamten Versuchs nahezu konstant bei ca. 37,3°C (nicht gezeigt). Trotz der verwendeten Heizplatte (37-40°C) fiel die Körpertemperatur in den Tieren der beiden Schockgruppen während der Schockphase deutlich auf ca. 36,5°C ab. Nach der Schockphase stieg die Körpertemperatur der Schock-RL + Blut-Tiere schnell wieder an und erreichte die Werte der normoxischen Kontrollgruppe. Die Körpertemperatur der Schock-RL-Tiere stieg nach der therapeutischen Volumensubstitutionsphase nur leicht (auf ca. 36,7°C) und fiel kurz vor dem Tod der Tiere wieder ab (nicht gezeigt).

Die mittels Pulsoximetrie gemessene O<sub>2</sub>-Sättigung des arteriellen Blutes lag bei den normoxischen Tieren konstant über 95% (nicht gezeigt). Bei vielen Tieren der Schockgruppen konnte die pulsoximetrische Messung am Hinterlauf während der Schockphase nicht durchgeführt werden. Dies lag wahrscheinlich an einer starken Zentralisierung des Blutkreislaufs der Tiere in der Schockphase, während der nur noch die absolut lebensnotwendigen Organe mit Blut versorgt werden. Durch diese Zentralisierung war die Durchblutung der Extremitäten wahrscheinlich so stark eingeschränkt, dass keine Messung mittels einer Pulsoximetrieklemme am Hinterbein mehr möglich war. Ab dem Beginn der therapeutischen Volumensubstitution konnte bei vielen der Schock-RL + Blut-Tiere wieder eine Messung erfolgen, wohingegen bei den Schock-RL-Tieren weiterhin kaum pulsoximetrische Messungen möglich waren (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet in Übereinstimmung mit den Blutdruckverläufen (Abb. 8A) darauf hin, dass die Zentralisierung bei den Schock-RL + Blut-Tieren unmittelbar nach der Schockphase wieder abnahm, während sie bei den Schock-RL-Tieren bis zu deren Tod vorherrschend blieb .

### **3.1.2. Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks auf die Blutgasanalyse, Elektrolytkonzentrationen und metabolische Parameter**

In der normoxischen Kontrollgruppe blieben der pH-Wert, der O<sub>2</sub>-Partialdruck, der CO<sub>2</sub>-Partialdruck, die O<sub>2</sub>-Sättigung, die Osmolalität, der Hämatokritwert, die Hämoglobinkonzentration, der Säure-Basen-Status und die Bikarbonatkonzentration im arteriellen Blut während des gesamten Versuchs nahezu konstant (Abb. 9 bzw. nicht gezeigt).

Der pH-Wert und Basenüberschuss des Blutes nahmen in den Schockgruppen im Verlauf der Schockphase stark ab (pH unter 7,1; SBS unter -15 mmol/L). In der Schock-RL + Blut-Gruppe stiegen nach der therapeutischen Volumensubstitution wieder auf 7,2 (pH) bzw. -10 mmol/L (SBS) an. Während der pH-Wert bis zum Versuchsende konstant auf diesem Niveau blieb, sank der SBS im weiteren Versuchsverlauf in der Schock-RL + Blut-Gruppe wieder auf -14 mmol/L ab (Abb. 9A, B). Der pH-Wert und der Basenüberschuss stiegen während der therapeutischen Volumensubstitution in der Schock-RL-Gruppe während der Volumensubstitution nur unwesentlich (pH: 7,1; SBS: -14 mmol/L; Abb. 9A, B). Diese Ergebnisse für den pH-Wert und den Säure-Basen-Status zeigen die schwere, durch den O<sub>2</sub>-Mangel im hämorrhagischen Schock verursachte, metabolische Azidose und deren zeitweise Kompensation nach der Volumensubstitution. Fast identisch zum Verlauf des SBS war der Verlauf der HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration im Blut (Abb. 9C). Dies erklärt sich aus der wichtigen Bedeutung des HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> als pH-Puffer im Blut. Verändert sich die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration und damit ihre Pufferkapazität, so ändert sich zwangsläufig auch der SBS in vergleichbarer Weise.



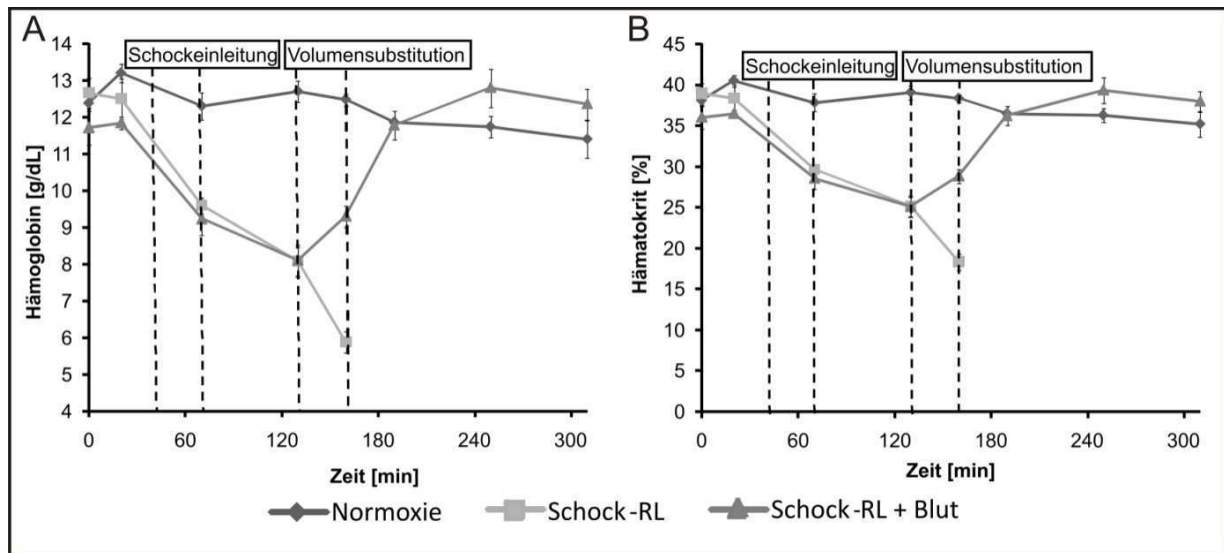
**Abb. 9:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf die Blutgasanalyse. A) pH-Wert; B) Säure-Basen-Status; C) HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration; D) CO<sub>2</sub>-Partialdruck. Alle Parameter wurden in frisch abgenommenem arteriellem Vollblut bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (Normoxie: n=4; Schock-RL: n=6; Schock-RL + Blut: n=6). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Kurve der Schock-RL-Gruppe endet mit dem ersten verstorbenen Tier dieser Gruppe. Abkürzungen: RL = Ringer-Laktat-Lösung; SBS = Säure-Basen-Status.

Für beide Schockgruppen war während des Schocks ein deutliches Absinken des CO<sub>2</sub>-Partialdruckes festzustellen (Abb. 9D). Die Werte sanken auf unter 40 mmHg, während sie in der normoxischen Gruppe bei ca. 50 mmHg konstant blieben. In der therapeutischen Volumensubstitutionsphase stiegen die pCO<sub>2</sub>-Werte der Schockgruppen wieder an. Nach dem Ende der therapeutischen Volumensubstitution sanken sie dann in der Schock-RL + Blut-Gruppe wieder deutlich ab (Abb. 9D). Die Verläufe des CO<sub>2</sub>-Partialdruckes untermauern den Verdacht einer Zentralisierung während der Schockphase. Aufgrund der Zentralisierung kann das in der Peripherie entstehende CO<sub>2</sub> vom Blut vermutlich nicht abtransportiert werden, was den verminderten CO<sub>2</sub>-Partialdruck während der Schockphase erklärt. Während der therapeutischen Volumensubstitution und dem damit verbundenen Blutdruckanstieg



wird dann das im Gewebe verbliebene CO<sub>2</sub> durch die jeweilige Volumensubstitutionslösung „ausgewaschen“, was an dem, vor allem in der Schock-RL + Blut-Gruppe, deutlich erhöhten CO<sub>2</sub>-Partialdruck in dieser Phase zu erkennen ist.

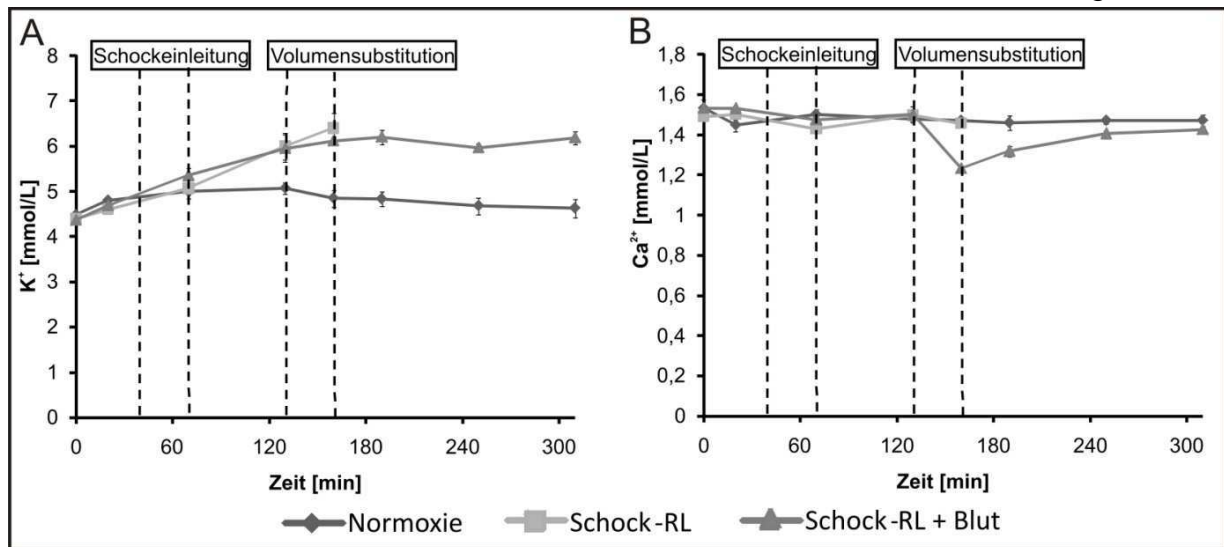
In beiden Schockgruppen fiel die Hämoglobinkonzentration am Ende der Schockeinleitung auf 9,5 g/dL und der Hämatokrit auf 29% (Abb. 10A, B). Diese Abnahme der Werte setzte sich tendenziell bis zum Schockende fort (Hämoglobinkonzentration: 8 g/dL; Hämatokrit: 25%). Die Absenkung der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokritwertes während der Schockeinleitung und der Schockphase kann mit einer Flüssigkeitsverschiebung vom Interstitium in die Gefäße erklärt werden. Dadurch kommt es zu einer „Verdünnung“ des Blutes, und somit zur beschriebenen Absenkung der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokritwertes. Während der Volumensubstitution und bis zum Tod der Tiere fielen in der Schock-RL-Gruppe beide Werte weiter ab, was durch die zusätzliche „Verdünnung“ des Blutes durch die RL-Lösung zu erklären ist. Dem entgegengesetzt stiegen in der Schock-RL + Blut-Gruppe beide Werte ab der therapeutischen Volumensubstitution an und erreichten nach ca. 60 Minuten ihre Ausgangswerte. Dies deutet auf eine Flüssigkeitsverschiebung aus dem Gefäßlumen in das Interstitium hin, die durch die Volumensubstitution zu erklären ist. Durch diese blutdruckabhängige Flüssigkeitsverschiebung und bedingt durch das in der Volumensubstitutionslösung enthaltene Blut stieg dann in der Schock-RL + Blut-Gruppe die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokritwert wieder an.



**Abb. 10:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf die Hämoglobinkonzentration und auf den Hämatokrit-Wert. A) Hämoglobinkonzentration; B) Hämatokrit-Wert. Alle Parameter wurden in frisch abgenommenem arteriellem Vollblut bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=4; Schock-RL: n=6; Schock-RL + Blut: n=6). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Kurve der Schock-RL-Gruppe endet mit dem ersten verstorbenen Tier dieser Gruppe. Abkürzungen: RL = Ringer-Laktat-Lösung.

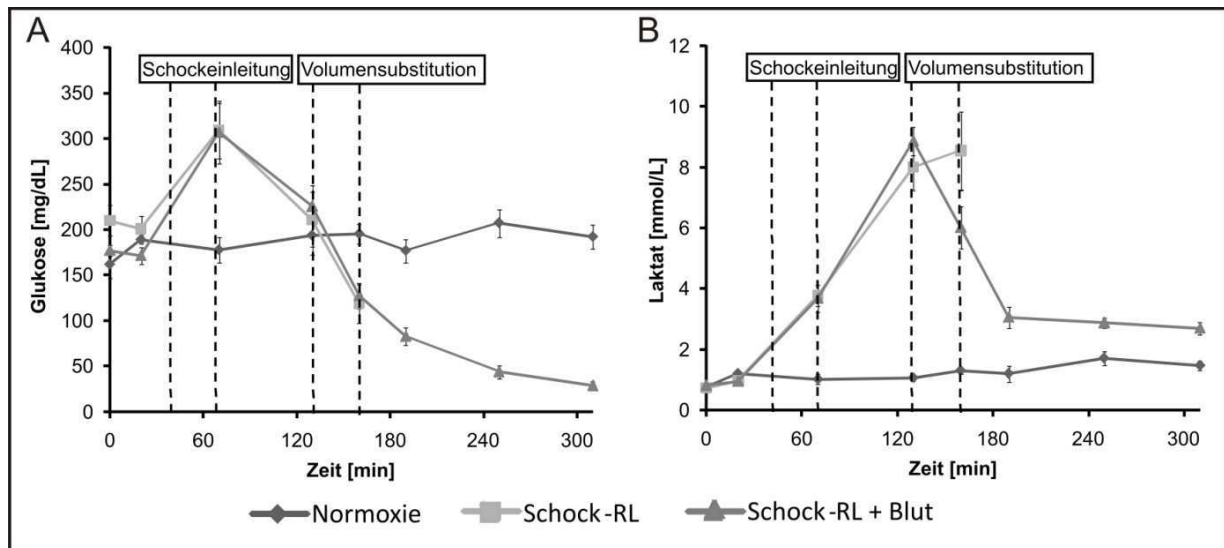
In der normoxischen Kontrollgruppe blieben die Plasmakonzentrationen der  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen (Abb.11), die Glukose- und Laktatkonzentration (Abb.12) sowie die  $Na^+$ - und die  $Cl^-$ -Konzentration (nicht gezeigt) des arteriellen Blutes während des gesamten Versuchs nahezu konstant. Für beide Schockgruppen war während der Schockphase ein Anstieg der  $K^+$ -Konzentration auf ca. 6 mmol/L festzustellen. Bis zum Versuchsende oder dem Tod der Tiere stiegen die Werte kaum noch weiter an. (Abb. 11A). Dieser Verlauf der  $K^+$ -Konzentration lässt sich nicht durch den Verlauf der Gewebeschädigung erklären ( $K^+$ -Ionen werden beim Zelluntergang ins Blut freigesetzt), da allen Schädigungsparametern zufolge (siehe 3.1.3. und 3.1.4.) die größte Zellschädigung erst nach der therapeutischen Volumensubstitution auftrat.

Die  $Ca^{2+}$ -Konzentration des Blutes war bei den Schock-RL + Blut-Tieren am Ende der therapeutischen Volumensubstitution deutlich erniedrigt ( $1,2 \pm 0,01$  mmol/L), stieg bis zum Versuchsende aber wieder bis annähernd auf den Ausgangswert ( $1,5 \pm 0,02$  mmol/L) an (Abb. 11B). Die Abnahme der  $Ca^{2+}$ -Konzentration infolge der therapeutischen Volumensubstitution ist durch die Komplexbildung der  $Ca^{2+}$ -Ionen durch das in der Volumensubstitutionslösung enthaltene Citrat (ACDA) erklärbar. Nach der Volumensubstitution gelangte kein weiteres Citrat mehr ins Blut, was zur Folge hatte, dass sich die physiologische  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration im Blut wieder einstellen konnte.



**Abb. 11:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf die Elektrolyte. A) K<sup>+</sup>-Konzentration; B) Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Alle Parameter wurden in frisch abgenommenem arteriellem Vollblut bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=4; Schock-RL: n=6; Schock-RL + Blut: n=6). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Kurve der Schock-RL-Gruppe endet mit dem ersten verstorbenen Tier dieser Gruppe. Abkürzungen: RL = Ringer-Laktat-Lösung.

Der Verlauf der Glukosekonzentration im Blut zeigte für beide Schockgruppen einen starken Anstieg während der Schockeinleitung auf bis zu 300 mg/dL (Abb. 12A). Während der darauf folgenden Schockphase und der therapeutischen Volumensubstitution fiel die Glukosekonzentration dann stark ab. Die Glukosekonzentration der Schock-RL + Blut-Tiere erreichte am Versuchsende Werte von ca. 30 mg/dL (Abb. 12A). Der starke Anstieg der Glukosekonzentration während der Schockeinleitung lässt sich durch eine verstärkte Bereitstellung von Glukose durch die Leber erklären (Gluconeogenese). Nachdem die Glykogenreserven der Leber erschöpft waren, sank die Konzentration der Glukose vermutlich aufgrund ihrer Verstoffwechselung durch anaerobe Glykolyse rasch ab.



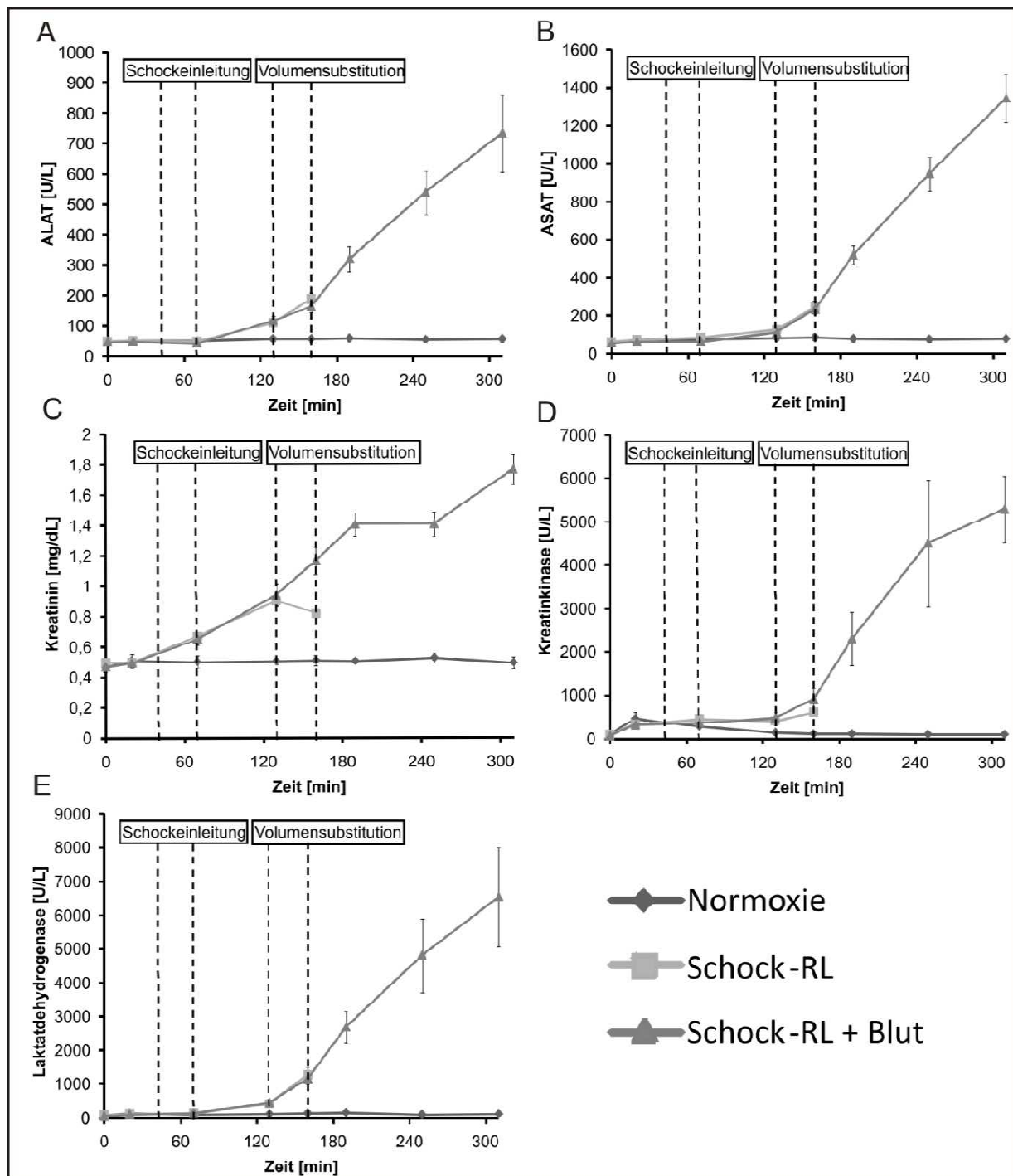
**Abb. 12:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf die Glukose- und Laktatkonzentration. A) Glukosekonzentration; B) Laktatkonzentration. Alle Parameter wurden in frisch abgenommenem arteriellem Vollblut bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=4; Schock-RL: n=6; Schock-RL + Blut: n=6). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Kurve der Schock-RL-Gruppe endet mit dem ersten verstorbenen Tier dieser Gruppe. Abkürzungen: RL = Ringer-Laktat-Lösung.

Der Verlauf der Laktatkonzentration wies in beiden Schockgruppen einen starken Anstieg während der Schockeinleitung und der Schockphase auf (Abb. 12B). Die maximale Laktatkonzentration von ca. 8,5 mmol/L wurde in der Schock-RL + Blut-Gruppe am Ende der Schockphase und in der Schock-RL-Gruppe erst am Ende der Volumensubstitution erreicht. Danach sank die Laktatkonzentration bis 30 Minuten nach Ende der Volumensubstitution für die Schock-RL + Blut-Tiere auf eine Konzentration von ca. 3 mmol/L ab. Für die restliche Dauer des Versuchs blieb die Laktatkonzentration in dieser Gruppe konstant auf diesem Niveau (Abb. 12B). Der im Verhältnis zur Glukose verzögerte Anstieg der Laktatkonzentration kann mit der in der anaeroben Glykolyse erfolgenden Umsetzung der freigesetzten Glukose zu Laktat erklärt werden. Im weiteren Verlauf wurde das Laktat vermutlich von der Leber der Schock-RL + Blut-Tiere abgebaut und die geschädigten Zellen produzierten nach der therapeutischen Volumensubstitution möglicherweise nur noch wenig Laktat. Eine Erklärung für den in der Schock-RL-Gruppe erfolgenden Anstieg der Laktatkonzentration während der therapeutischen Volumensubstitution könnte eine starke Leberschädigung sein, die einen Abbau des anfallenden Laktats verhinderte. Darüberhinaus könnte auch eine verminderte Perfusion der Leber in dieser Gruppe verhindert haben, dass das Laktat die Leber überhaupt erreichte.

Für die Parameter  $O_2$ -Partialdruck,  $O_2$ -Sättigung,  $Cl^-$ ,  $Na^+$  und für die Osmolarität konnten keine signifikanten Verlaufsunterschiede im Vergleich zur normoxischen Kontrolle festgestellt werden (nicht gezeigt).

### **3.1.3. Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks auf enzymatische Organschädigungsmarker und die Kreatininkonzentration im Blutplasma**

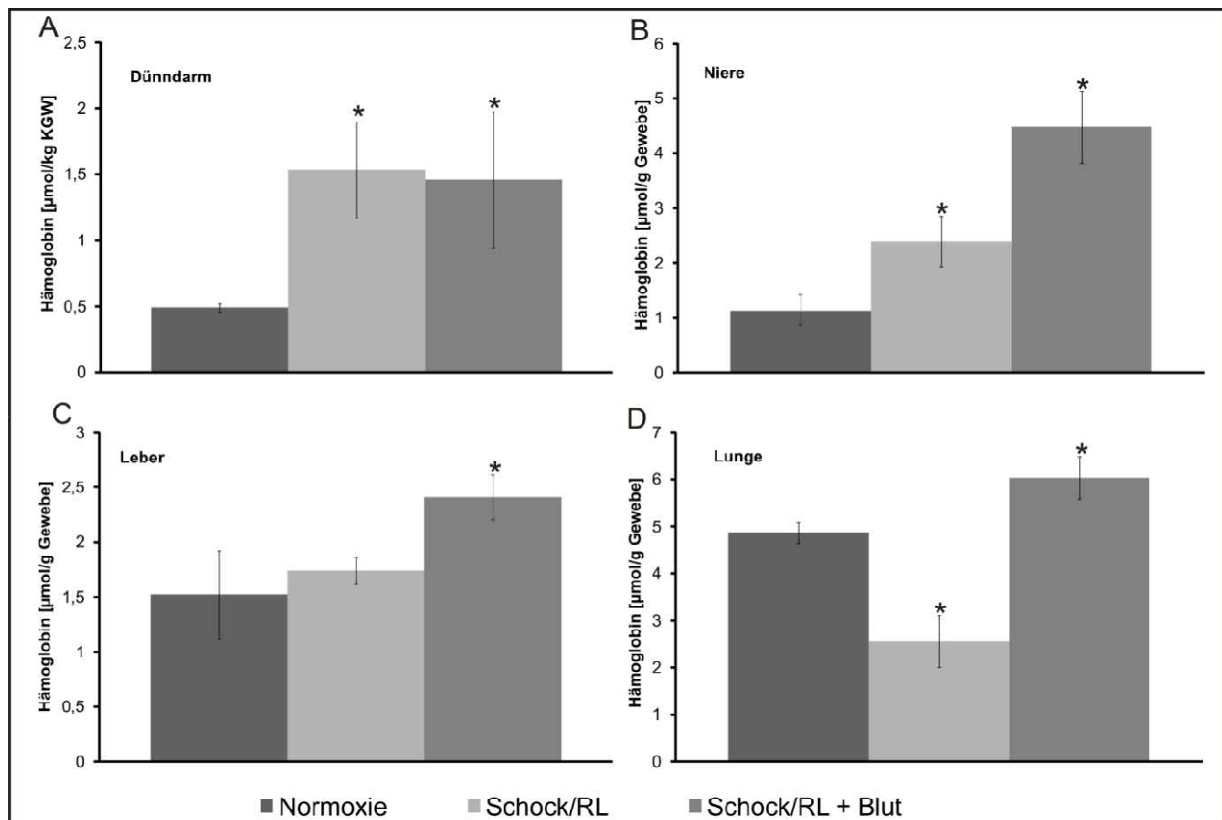
Im Plasma der normoxischen Kontrollgruppe blieb die Aktivität der ALAT (Abb. 13A) und der ASAT (Abb. 13B; Marker für Leberschädigung), die Kreatininkonzentration (Abb. 13C; Marker für Nierenschädigung) sowie die Aktivität der CK (Abb. 13D; Marker für Muskelschädigung) und der LDH (Abb. 13E; Marker für unspezifische Zellschädigung) während des gesamten Versuchs sehr niedrig. In beiden Schockgruppen stiegen alle Werte dieser Schädigungs- und Funktionsmarker während der Schockphase deutlich an (sechsfach für LDH; vierfach für CK; zweifach für ALAT, ASAT und Kreatinin). Dieser Anstieg setzte sich bis zum Ende der Volumensubstitution fort (erneute Verdopplung der Werte; nur die Kreatininkonzentration in der Schock-RL-Gruppe blieb konstant). Der verminderte Anstieg der Kreatininkonzentration in der Schock-RL-Gruppe kann möglicherweise auf den Verdünnungseffekt der Volumensubstitutionslösung zurückgeführt werden, der im Falle der Kreatininkonzentration stärker zu sein scheint als der Effekt des Nierenfunktionsverlustes, durch den die Kreatininkonzentration ansteigen müsste. Für die anderen Schädigungs- und Funktionsmarker scheint die zusätzliche Schädigung durch die therapeutische Volumensubstitution die Verdünnungseffekte durch die Volumensubstitutionslösung zu überwiegen. Im weiteren Verlauf des Versuches stiegen alle Werte in der Schock-RL + Blut-Gruppe -bis auf Kreatinin, dessen Konzentration nur leicht anstieg- bis zum Versuchsende erneut um das Sechs- bis Siebenfache an. Dieser starke Anstieg nach der Volumensubstitution deutet auf eine besonders intensive Schädigung in dieser Phase hin.



**Abb. 13:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf Enzymaktivitäten und die Kreatininkonzentration. A) Alanin-Aminotransferaseaktivität; B) Aspartat-Aminotransferaseaktivität; C) Kreatininkonzentration; D) Kreatinkinaseaktivität; E) Laktatdehydrogenaseaktivität. Alle Parameter wurden im Blutplasma gemessen. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=4; Schock-RL: n=6; Schock-RL + Blut: n=6). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Kurve der Schock-RL-Gruppe endet mit dem ersten verstorbenen Tier dieser Gruppe. Abkürzungen: ALAT = Alanin-Aminotransferase; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; RL = Ringer-Laktat-Lösung.

### **3.1.4. Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks auf die Histopathologie und andere Schädigungsmarker in den Organen**

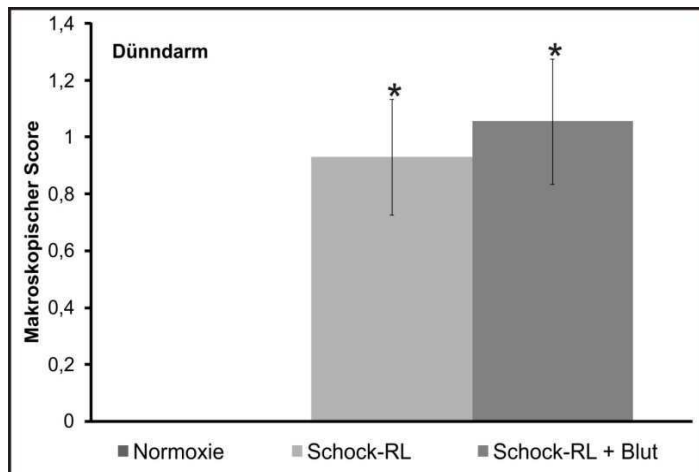
In allen Organen der Tiere aus der Schock-RL + Blut-Gruppe zeigte sich, verglichen mit der normoxischen Kontrollgruppe, eine deutliche Erhöhung des Hämoglobingehalts (Abb. 14 A-D). Der Hämoglobingehalt eines Organs kann entweder durch eine Einblutung ins Gewebe oder durch eine stärkere Durchblutung des Organs erhöht werden. In beiden Fällen kann der Hämoglobingehalt als Indikator für mögliche Organschäden herangezogen werden. Die Werte für die Schock-RL-Gruppe zeigten sich indifferent. Es konnte sowohl ein Anstieg (Niere, Darm), keine Veränderung (Leber) als auch ein Absinken (Lunge) des Hämoglobinsgehalts im Vergleich mit der normoxischen Kontrollgruppe beobachtet werden. Diese Effekte können zum einen durch die höhere Verdünnung des Blutes durch die Volumensubstitution mit RL und zum anderen durch die kürzere Schädigungsdauer aufgrund des vorzeitigen Todes der Tiere dieser Gruppe erklärt werden.



**Abb. 14:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf den Hämoglobingehalt im Organgewebe. A) Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes; B) Hämoglobingehalt des Nierengewebes; C) Hämoglobingehalt des Lebergewebes; D) Hämoglobingehalt des Lungengewebes. Die Hämoglobinkonzentration wurde photometrisch im Überstand der Organhomogenate bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=4; Schock-RL: n=6; Schock-RL + Blut: n=6). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Tiere der Schock-RL-Gruppe starben bereits vor dem Versuchsende. \* $p < 0,05$  vs. Normoxie. Abkürzungen: KGW = Körpergewicht; RL = Ringer-Laktat-Lösung.

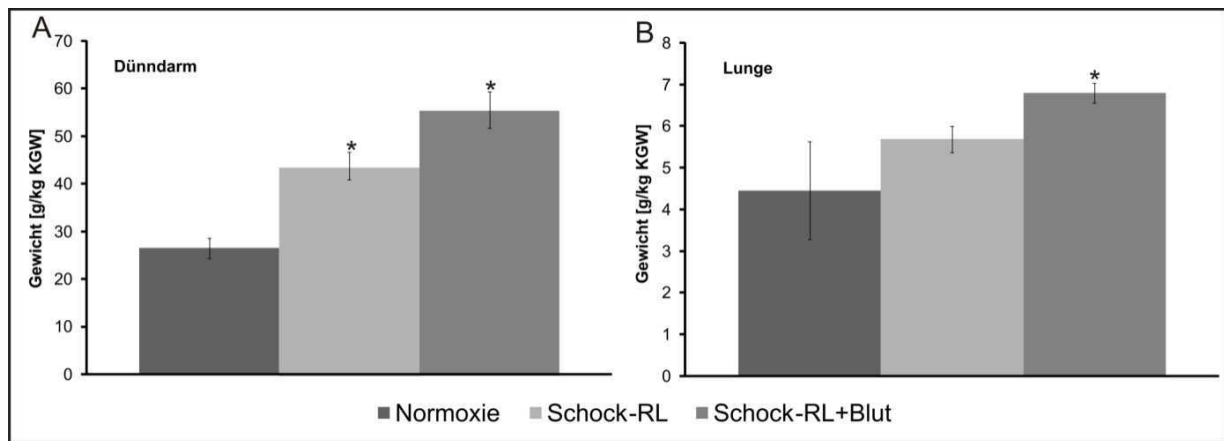
Im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe war die makroskopische Schädigung des Dünndarms in beiden Schockgruppen deutlich sichtbar. Beide Schockgruppen erreichten einen „Makroscore“ von ca. 1,1 (Abb. 15), was einer eher leichten Schädigung entspricht.





**Abb. 15:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf die makroskopische Schädigung des Dünndarms. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=4; Schock-RL: n=6; Schock-RL + Blut: n=6) Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Tiere der Schock-RL-Gruppe starben bereits vor dem Versuchsende. \*p < 0,05 vs. Normoxie. Abkürzungen: RL = Ringer-Laktat-Lösung.

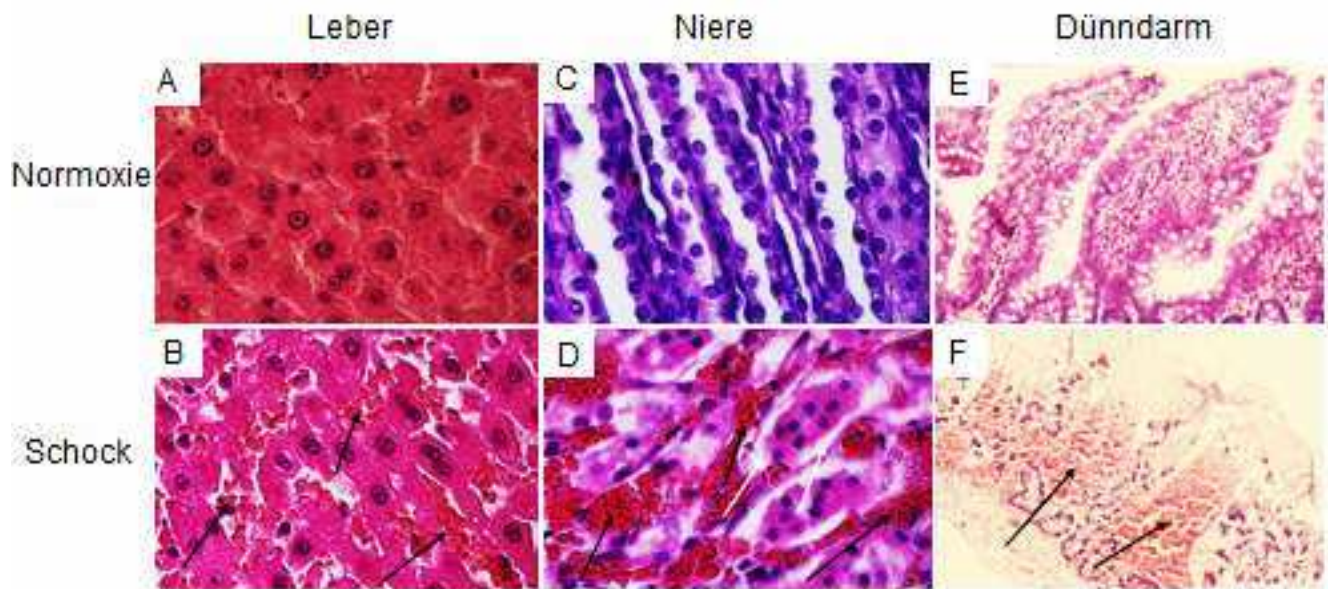
In der normoxischen Kontrollgruppe lag das Dünndarmgewicht bei ca. 27 g/kg KGW (Abb. 16A) und das Lungengewicht betrug ca. 4,4 g/kg KGW (Abb. 16B). Das Lungen- und Dünndarmgewicht war in der Schock-RL + Blut-Gruppe im Verhältnis zur normoxischen Kontrolle deutlich höher (Dünndarm: ca. 55 g/kg KGW; Lunge: ca. 6,9 g/kg KGW). In der Schock-RL-Gruppe war die Gewichtszunahme der Organe geringer (Dünndarm: ca. 43 g/kg KGW; Lunge: ca. 5,7 g/kg KGW). Diese Gewichtserhöhungen in den Schockgruppen lassen sich für den Darm mit einer Transsudation von Plasma in das Darmlumen während und nach der therapeutischen Volumensubstitution erklären. Im Falle der Lunge deutet die Gewichtserhöhung auf die Ausbildung von Lungenödem hin. Die Differenzen zwischen den beiden Schockgruppen lassen sich auch hier mit dem längeren Überleben (längere Schädigungsdauer) der Schock-RL + Blut-Tiere erklären, die dadurch mehr Ödeme im Dünndarm und in der Lunge entwickeln konnten. Für das Nass-Trocken-Gewicht des Dünndarms konnten keine Unterschiede zwischen der normoxischen Kontrollgruppe und den Schockgruppen beobachtet werden (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass keine Ödeme in der Darmwand ausgebildet wurden.



**Abb. 16:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit RL oder RL + Blut auf das Gewicht des Dünndarms und der Lunge. A) Gewicht des Dünndarms; B) Gewicht der Lunge. Die Wägung der Organe fand unmittelbar nach deren Entnahme statt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=4; Schock-RL: n=6; Schock-RL + Blut: n=6). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Tiere der Schock-RL-Gruppe starben bereits vor dem Versuchsende. \*p < 0,05 vs. Normoxie. Abkürzungen: KGW = Körpergewicht; RL = Ringer-Laktat-Lösung.

Da bei den Tieren, die vorzeitig verstarben, und auch bei einigen überlebenden Tieren am Ende des Versuchs aus technischen Gründen (zu geringer Blutdruck) keine für die Laboruntersuchung ausreichenden Mengen an Blut abgenommen werden konnten, konnten für Gerinnungs- und Blutbildparameter in dieser Serie nicht genug Werte gemessen werden, um statistisch belastbare Aussagen machen zu können. Aus diesen Gründen wird für diese Versuchsserie auf die Darstellung und Interpretation dieser Parameter verzichtet.

Der hämorrhagische Schock und die therapeutische Volumensubstitution verursachten deutliche histologische Veränderungen in der Niere, Leber und im Dünndarm. Besonders eindeutig waren diese Veränderungen in der Schock-RL + Blut-Gruppe (Abb. 17). In den Proben aus der Lunge und dem Herz konnte unter diesen Versuchsbedingungen keine Schädigung festgestellt werden (nicht gezeigt), da sich in diesen Organen eine histologisch sichtbare Schädigung wahrscheinlich erst später ausbildet. In den Organen der normoxischen Kontrolltiere waren keine Schädigungen sichtbar.



**Abb. 17:** Histopathologische Veränderungen durch hämorrhagischen Schock und die Volumensubstitution mit RL + Blut in der Leber, Niere und dem Dünndarm bei einer Schockdauer von 60 Minuten, 30 Minuten therapeutischer Volumensubstitution und 150 Minuten anschließender Beobachtungszeit. Die Bilder zeigen Schnitte, die repräsentativ für sechs Schock- und vier normoxische Tiere sind. Besonders fallen die stark erhöhte Anzahl an Erythrozyten im Leber- und Nierengewebe (schwarze Pfeile) sowie die Ablösung der Nierentubuluszellen von ihrer Basalmembran auf (weiße Pfeile). Im Dünndarm sind ausgeprägte nekrotische Hämorrhagien zu sehen. Hämatoxylin/Eosin-Färbung; Originalvergrößerung: 400x (A-D); 100x (E und F).

### 3.2. Ergebnisse der Versuchsserie zum Vergleich von Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung

Nach der Etablierung des Versuchsmodells wurden in einer zweiten Versuchsserie die Effekte der klinisch zur Volumensubstitution eingesetzten Ringer-Lösung (R) und Ringer-Laktat-Lösung (RL) miteinander verglichen, um zu ermitteln, welche der beiden eine effektivere Behandlung des hämorrhagischen Schocks ermöglicht und möglicherweise als Trägerlösung für Schutzstoffe geeignet sein könnte.

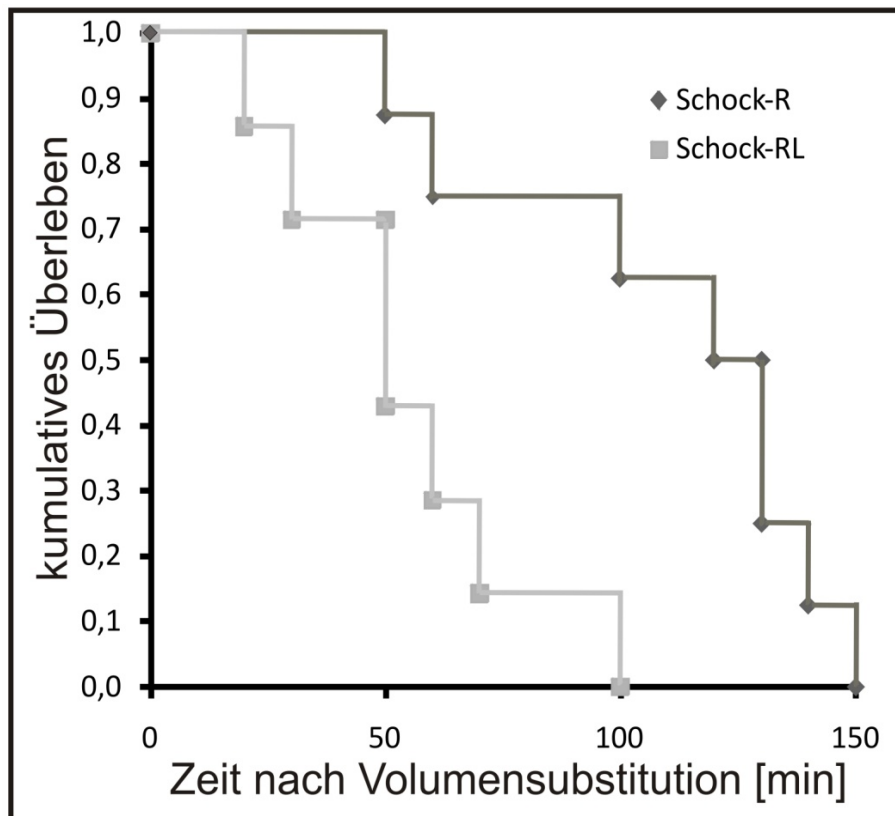
Sofern nicht anders erwähnt, entsprachen die Werte der normoxischen Kontrollgruppe den in der Serie zur Modelletablierung beschriebenen Werten.

### **3.2.1. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf die Vitalparameter nach hämorrhagischem Schock**

Die Zeitverläufe des MAB, der Herzfrequenz, der Atemfrequenz und der Körpertemperatur in der Schock-RL-Gruppe und der Schock-RL + Blut-Gruppe entsprachen weitestgehend den jeweiligen Verläufen aus der Vorserie (siehe 3.1.1., Abb.8). Hinsichtlich der zeitgleichen Werte dieser Parameter gab es keine Unterschiede zwischen den Verläufen der Schock-RL-Gruppe und der Schock-R-Gruppe (nicht gezeigt). Auch die Verläufe der Schock-RL + Blut-Gruppe und der Schock-R + Blut-Gruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander (nicht gezeigt). Aufgrund der fehlenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wird hier auf eine erneute detaillierte Beschreibung der Kurven verzichtet.

### **3.2.2. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf die Überlebenszeit nach hämorrhagischem Schock**

Die Überlebenszeiten der Tiere der Schock-R- und der Schock-RL-Gruppe im Anschluss an die Volumensubstitution unterschieden sich signifikant. Hundert Minuten nach der Volumensubstitution waren alle acht Ratten der Schock-RL-Gruppe verstorben, während zu diesem Zeitpunkt von den acht Schock-R-Tieren erst drei gestorben waren (Abb. 18). In der Schock-RL + Blut-Gruppe und der Schock-R + Blut-Gruppe überlebten alle Tiere bis zum Versuchsende.

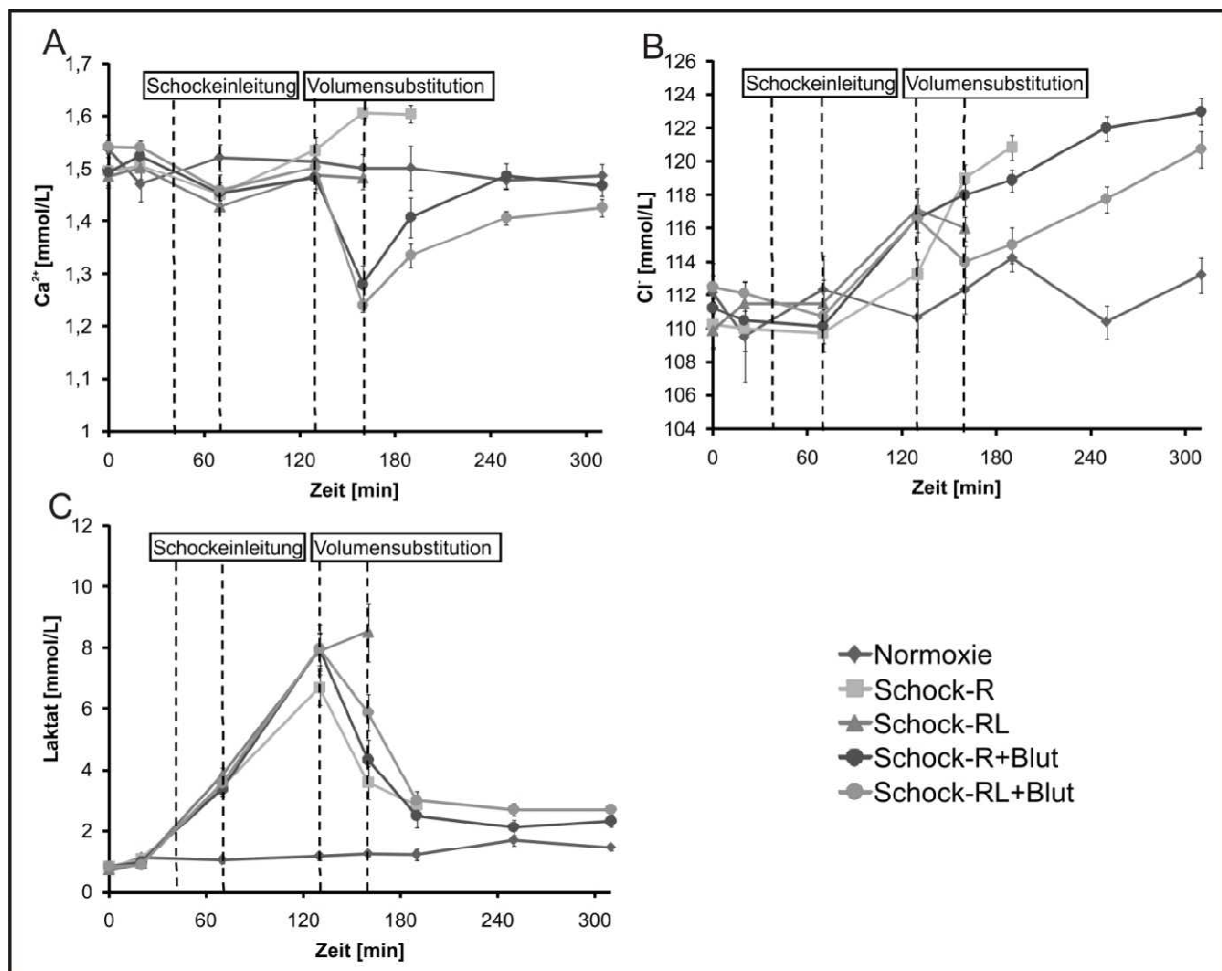


**Abb. 18:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit R oder RL auf das kumulative Überleben der Versuchstiere. Dargestellt ist der Zeitraum von 150 Minuten nach dem Ende der Volumensubstitution. Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Abkürzungen: R = Ringer-Lösung; RL = Ringer-Laktat-Lösung.

### 3.2.3. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf die Blutgasanalyse, Elektrolytkonzentrationen und metabolische Parameter nach hämorrhagischem Schock

Die Zeitverläufe des pH-Wertes, des SBS, des  $O_2$ - und  $CO_2$ -Partialdruckes, der  $O_2$ -Sättigung, der Osmolalität, des Hämatokritwertes sowie der Konzentrationen von Hämoglobin,  $HCO_3^-$ ,  $K^+$ -Ionen,  $Na^+$ -Ionen und Glukose im arteriellen Blut entsprachen in der Schock-RL-Gruppe und der Schock-RL + Blut-Gruppe weitestgehend den jeweiligen Verläufen aus der Vorserie (siehe 3.1.3). Hinsichtlich der zeitgleichen Werte dieser Parameter gab es keine Unterschiede zwischen den Verläufen der Schock-RL-Gruppe und der Schock-R-Gruppe (nicht gezeigt). Auch die Verläufe der Schock-RL + Blut-Gruppe und der Schock-R + Blut-Gruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander (nicht gezeigt).

In einigen Parametern gab es jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. So blieb die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der therapeutischen Volumensubstitution in der Schock-RL-Gruppe konstant, stieg aber in der Schock-R-Gruppe sogar deutlich an (Abb. 19A). In der Schock-R + Blut-Gruppe und der Schock-RL + Blut-Gruppe fiel die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bedingt durch das ACDA im transfundierten Blut (vgl. 3.1.3.) gleich weit ab. Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Volumensubstitution in der Schock-R-Gruppe kann durch den höheren Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in R-Lösung (2,25 mM) im Vergleich zu RL-Lösung (1,84 mM) erklärt werden. Auch die unterschiedlichen  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen in der R-Lösung (155,7 mM) und der RL-Lösung (112 mM) wirken sich entsprechend auf die Plasma- $\text{Cl}^-$ -Konzentration der Ratten nach der therapeutischen Volumensubstitution aus. Während die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration in der Schock-RL + Blut-Gruppe während der Volumensubstitution absank, war für die R + Blut Gruppe in dieser Phase ein Anstieg zu beobachten (Abb. 19B). Ebenso sank während der Volumensubstitution auch die  $\text{Cl}^-$ -Ionenkonzentration in der Schock-RL-Gruppe, stieg aber deutlich in der Schock-R-Gruppe. Nach der therapeutischen Volumensubstitution stieg die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration in allen Schockgruppen bis zum Versuchsende bzw. dem Tod der Tiere deutlich an.



**Abb. 19:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit R, RL, R + Blut oder RL + Blut auf die Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> und Laktat im Blut. A) Ca<sup>2+</sup>-Konzentration; B) Cl<sup>-</sup>-Konzentration; C) Laktatkonzentration. Alle Parameter wurden in frisch abgenommenem arteriellem Vollblut bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=6; alle Schockgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Kurven der Schock-R- und Schock-RL-Gruppe enden mit dem ersten verstorbenen Tier dieser Gruppen. Abkürzungen: R = Ringer-Lösung; RL = Ringer-Laktat-Lösung.

Bezüglich des Laktats im Blut war besonders auffällig, dass seine Konzentration in der Schock-RL-Gruppe während der therapeutischen Volumensubstitution und danach bis zum Tod der Tiere anstieg (bis auf über 8 mmol/L), während sie für die Schock-R-Gruppe (wie auch für beide Gruppen, in deren Volumensubstitutionslösung Blut enthalten war) in diesem Zeitraum stark abfiel (bis unter 4 mmol/L) (Abb.19C). Der Anstieg der Laktatkonzentration in der Schock-RL-Gruppe könnte auf eine stärkere Leberschädigung durch die reine RL-Lösung hindeuten, durch die in dieser Versuchsgruppe die Metabolisierung von Laktat stark beeinträchtigt war.

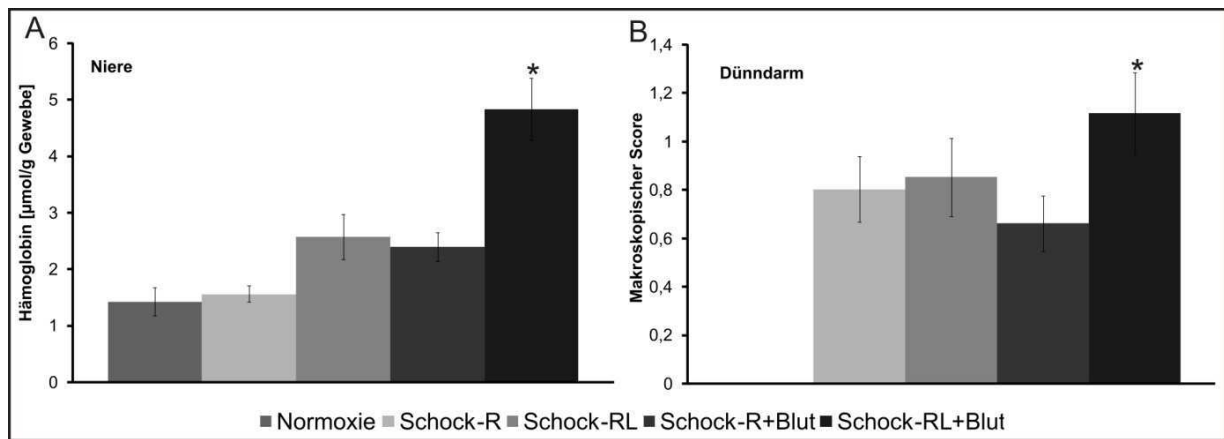
### **3.2.4. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf enzymatischen Organschädigungsmarker und die Kreatininkonzentration im Blutplasma nach hämorrhagischem Schock**

Die Zeitverläufe der Aktivitäten der ALAT, ASAT, LDH und CK und die Konzentration von Kreatinin im arteriellen Blut entsprachen in der Schock-RL-Gruppe und der Schock-RL + Blut-Gruppe weitestgehend den jeweiligen Verläufen aus der Vorserie (siehe 3.1.4., Abb. 13). Hinsichtlich dieser Parameter gab es keine Unterschiede zwischen den Verläufen der Schock-RL-Gruppe und der Schock-R-Gruppe (nicht gezeigt). Auch die Verläufe der Schock-RL + Blut-Gruppe und der Schock-R + Blut-Gruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander (nicht gezeigt). Aufgrund der fehlenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wird hier auf eine erneute detaillierte Beschreibung der Kurven verzichtet.

### **3.2.5. Einfluss der Volumensubstitution mit Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung auf die Histopathologie und andere Schädigungsmarker in den Organen nach hämorrhagischem Schock**

Tendenziell zeigte sich für den Dünndarm, die Niere und die Leber, dass die Gewebekonzentration des Hämoglobins für die Schock-RL-Tiere im Vergleich mit den Schock-R-Tieren erhöht war (Abb. 20, Tab. 1). Ebenso gab es tendenziell eine Erhöhung der Hämoglobinkonzentration in der Schock-RL + Blut-Gruppe im Vergleich zur Schock-R + Blut-Gruppe. Ein gegensätzliches Bild zeigte sich tendenziell für die Hämoglobinkonzentration der Lunge (nicht gezeigt). Hier war die Hämoglobinkonzentration in der Schock-R-Gruppe höher als in der Schock-RL-Gruppe. Als signifikant erwies sich jedoch nur die Erhöhung der Hämoglobinkonzentration der Schock-RL + Blut-Gruppe im Vergleich zur Schock-R + Blut Gruppe in der Niere (Abb. 20A).





**Abb. 20:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit R, RL, R + Blut oder RL + Blut auf den Hämoglobingehalt des Nierengewebes und die makroskopische Schädigung des Dünndarms. A) Hämoglobingehalt des Nierengewebes; der Parameter wurde photometrisch im Überstand des Nierenhomogenats bestimmt. B) Makroskopische Schädigung des Dünndarms. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=6; alle Schockgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 60 Minuten. Die Tiere der Schock-R- und Schock-RL-Gruppe starben bereits vor dem Versuchsende. \*p < 0,05 vs. Schock-R + Blut. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: R = Ringer-Lösung; RL = Ringer-Laktat-Lösung.

In der Niere konnten außerdem schwerwiegende histopathologische Veränderungen in den Schockgruppen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle festgestellt werden (Tab. 1). So war der Blutgehalt in der Nierenrinde sowie im inneren und äußeren Nierenmark signifikant erhöht, es wurde ein hoher Anteil an geschrumpften und eingebluteten Glomeruli beobachtet und die Basalmembran war, sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark, häufig von den Tubuluszellen abgelöst. Diese pathologischen Veränderungen traten in der Schock-RL + Blut-Gruppe signifikant stärker auf als in der Schock-R + Blut-Gruppe. Im Gegensatz dazu waren die Unterschiede zwischen der Schock-RL-Gruppe und der Schock-R-Gruppe nur bezüglich des Blutgehaltes der Nierenrinde signifikant (Tab. 1).

	Normoxie	Schock-R	Schock-RL	Schock-R + Blut	Schock-RL + Blut
<b>Dünndarm</b>					
Park/Chiu-Score	0,2 ± 0,1	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,4
<b>Niere</b>					
Blutgehalt Rinde [%]	0,1 ± 0	8,1 ± 0,9	*15 ± 3,3	11,9 ± 2,8	**24,4 ± 6,7
Blutgehalt äußeres Mark [%]	0,3 ± 0,2	23,1 ± 2,5	27,9 ± 4,4	26,9 ± 7,1	**56,9 ± 8,3
Blutgehalt inneres Mark [%]	0,1 ± 0,1	17,5 ± 2,1	32,9 ± 9,1	22,8 ± 8	**51,3 ± 8,3
eingeb Blutet Glomeruli [%]	0,8 ± 0,8	47,5 ± 9	60 ± 10	46,9 ± 9,8	**80,6 ± 5,9
geschrumpfte Glomeruli [%]	3,2 ± 1,5	38,8 ± 5,5	51,4 ± 8,6	35,6 ± 7,4	**66,3 ± 5,7
Ablsg. BM Rinde [%]	0	4,1 ± 1,4	7,1 ± 1,8	2,6 ± 1,3	**10 ± 2,3
Ablsg. BM äußeres Mark [%]	0,8 ± 0,8	43,8 ± 10,5	43,6 ± 11,4	29,4 ± 9,3	**60,6 ± 8,8
Ablsg. BM inneres Mark [%]	0	45 ± 8,8	56,4 ± 12,4	31,3 ± 9,5	**66,9 ± 7,7
<b>Leber</b>					
Einblutung Sinusoide [E/GF]	4,8 ± 1,3	21,5 ± 3,5	29,6 ± 4,9	38,9 ± 10	29,9 ± 8
Granulozyten Infiltration [%]	3,2 ± 0,6	5,8 ± 2	3,7 ± 1,4	4,4 ± 0,6	5,4 ± 0,7
vakuolisierte Hepatozyten [%]	4,6 ± 2,6	41,4 ± 7,2	41,1 ± 9,7	47,4 ± 11,2	**20,2 ± 6,6

**Tab. 1:** Einfluss des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution mit R, RL, R + Blut oder RL + Blut auf die Histologie des Dünndarms, der Niere und der Leber. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (Normoxie: n=6; alle Schockgruppen: n=8). \*p < 0,05 vs. Schock-R; \*\*p < 0,05 vs. Schock-R + Blut. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: Ablsg. = Ablösung; BM = Basalmembran; E = Erythrozyten; GF = Gesichtsfeld; R = Ringer-Lösung; RL = Ringer-Laktat-Lösung.

Im Vergleich der Schock-RL-Gruppe mit der Schock-R-Gruppe konnten keine Unterschiede bezüglich der makroskopischen Schädigung des Dünndarms festgestellt werden (Abb. 20B). Im Gegensatz dazu zeigte sich für die Schock-RL + Blut-Tiere eine signifikant erhöhte Schädigung im Vergleich zu den Schock-R + Blut-Tieren. Für das Nass-Trocken-Gewicht des Dünndarms ergab sich eine prozentual größere Gewichtsabnahme in den Schockgruppen (77-78%) verglichen mit der normoxischen Kontrollgruppe (73-74%), was darauf hindeutet, dass die Ödembildung im Dünndarm in den Schockgruppen vermutlich deutlich erhöht war (nicht gezeigt). Die Gewichtsabnahmen der Schockgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Zwar war das Dünndarmgewicht für alle Schockgruppen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle deutlich erhöht jedoch konnten zwischen den einzelnen Schockgruppen keine Unterschiede festgestellt werden (nicht gezeigt).

Für den Darm war die histopathologische Schädigung in allen Schockgruppen deutlich erhöht, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zwischen der Schock-R-Gruppe und der Schock-RL-Gruppe bzw. zwischen den beiden Gruppen, die Blut zur Volumensubstitution erhielten (Tab. 1).

Die histopathologische Begutachtung der Leber ergab eine deutlich erhöhte Anzahl an Erythrozyten in den Sinusoiden und einen deutlich erhöhten Anteil an vakuolisierten Hepatozyten in allen Schockgruppen, jeweils verglichen mit der normoxischen Kontrollgruppe (Tab. 1). Die durch Granulozyten infiltrierten Bereiche

waren in keiner der Schockgruppen vergrößert. Während der Anteil der vakuolisierten Hepatozyten in der Schock-R-Gruppe und der Schock-RL-Gruppe etwa gleich hoch war, zeigte sich, dass sie in der Schock-RL + Blut-Gruppe deutlich niedriger lag als in der Schock-R + Blut-Gruppe. Bezüglich der sinusoidalen Erythrozytenzahl gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Schock-R-Gruppe und der Schock-RL-Gruppe bzw. zwischen den beiden Gruppen, die Blut zur Volumensubstitution erhielten (Tab. 1).

Für das Lungengewicht gab es keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (nicht gezeigt). Für Lunge und Herz konnten in keiner Versuchsgruppe histopathologische Schädigungen nachgewiesen werden (nicht gezeigt), da eine histologisch sichtbare Schädigung dieser Organe vermutlich erst bei deutlich länger andauernden Versuchen (mindestens 8 Stunden) auftritt.

Für die Schock-R-Gruppe und die Schock-RL-Gruppe konnten die Gerinnungs- und Blutbildparameter, aufgrund von den unter 3.1.4. beschriebenen Problemen bei der Blutabnahme, nur bei wenigen Tieren gemessen werden. Deshalb werden im Folgenden nur die normoxische Kontrolle, die Schock-R + Blut-Gruppe sowie die Schock-RL + Blut-Gruppe erwähnt. Effekte in den Schockgruppen, im Vergleich zur normoxischen Kontrolle, konnten nur bei den Gerinnungsparametern Thromboplastinzeit und Fibrinogengehalt festgestellt werden (nicht gezeigt). In der Schock-R + Blut-Gruppe (Thromboplastinzeit:  $63 \pm 2,3\%$ ; Fibrinogen:  $143,3 \pm 3,5$  mg/dL) und in der Schock-RL + Blut-Gruppe (Thromboplastinzeit:  $48,6 \pm 2,2\%$ ; Fibrinogen:  $120,4 \pm 13,6$  mg/dL) waren diese Parameter, im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Thromboplastinzeit:  $85,8 \pm 5,5\%$ ; Fibrinogen:  $190,2 \pm 16,2$  mg/dL) deutlich erniedrigt. Allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Schockgruppen. Die Absenkung der Thromboplastinzeit und des Fibrinogengehalts in den Schockgruppen deutete auf eine Gerinnungsaktivierung durch den hämorrhagischen Schock und/oder die Volumensubstitution hin.

### **3.3. Ergebnisse der Versuchsserie zur Protektion der Einzelschutzstoffe**

Aufbauend auf den Ergebnissen der Ringer vs. Ringer-Laktat-Serie, wurde in dieser Serie ausschließlich R + Blut zur Volumensubstitution eingesetzt. Für diese Versuchsserie werden nur Unterschiede zwischen der NaCl-Kontrollgruppe und den Schutzstoffgruppen (Glycin, Pyruvat, Resveratrol, Deferoxamin + LK 614) erwähnt, da nur diese Vergleiche zur Feststellung einer Schutzwirkung durch die Schutzstoffe herangezogen werden können.

#### **3.3.1. Einfluss der Einzelschutzstoffe auf die Vitalparameter nach hämorrhagischem Schock**

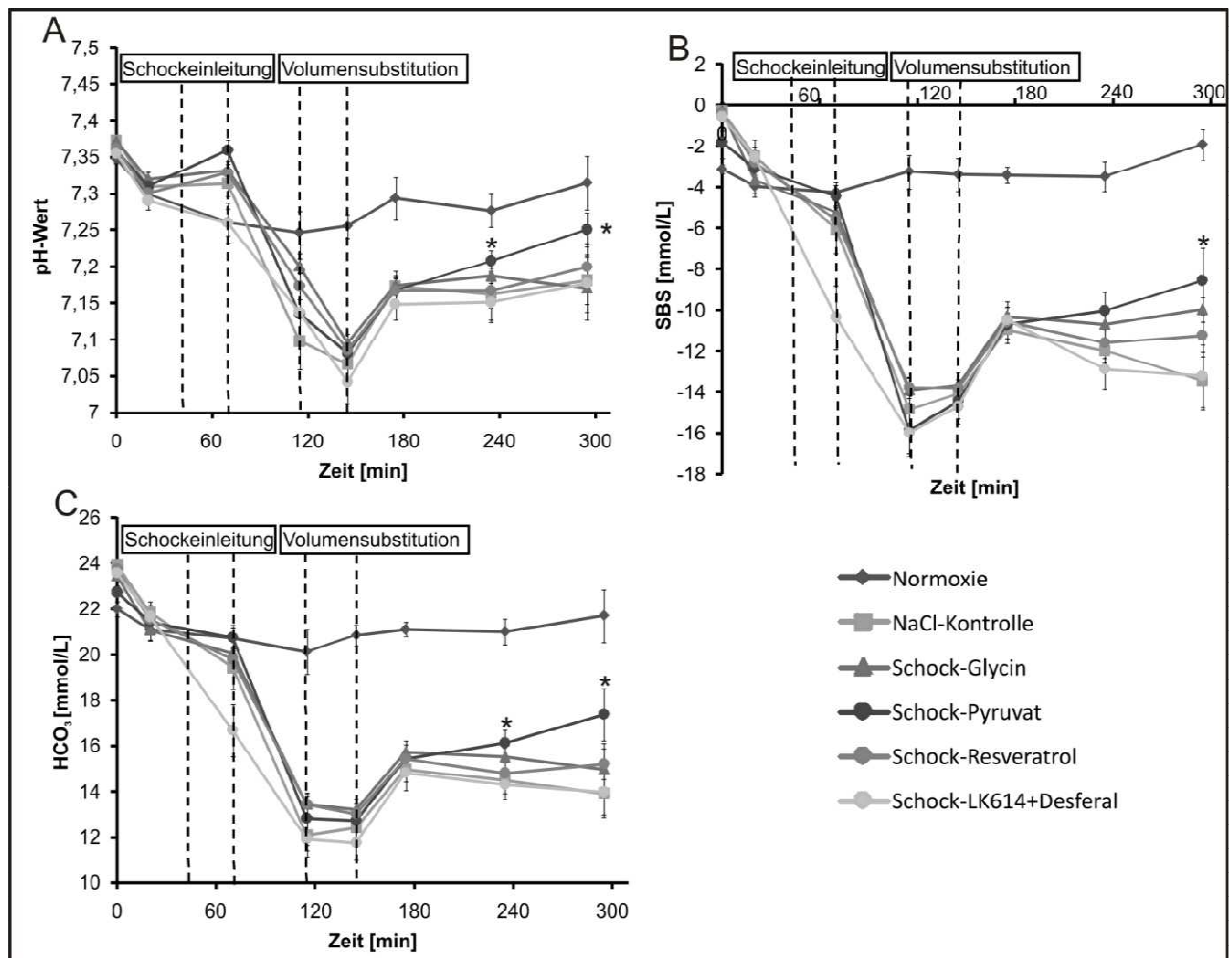
Bezüglich des MAB, der Herzfrequenz, der Atemfrequenz und der Körpertemperatur gab es in dieser Serie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Schockgruppen. Die Verläufe der Schutzstoffgruppen entsprachen denen der NaCl-Kontrollgruppe, welche wiederum deckungsgleich mit der Schock-R + Blut-Gruppe aus der Vorserie (siehe 3.2., Abb. 8) war. Aufgrund der fehlenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wird hier auf eine erneute detaillierte Beschreibung der Kurven verzichtet.

#### **3.3.2. Einfluss der Einzelschutzstoffe auf die Blutgasanalyse, Elektrolytkonzentrationen und metabolische Parameter nach hämorrhagischem Schock**

Zur Bestimmung möglicher Effekte der Schutzstoffe waren nur die Blutproben relevant, die nach Beginn der Schutzstoffinfusionen abgenommen wurden (Blutproben 5-8, vgl. Abb. 7). Deshalb wird für die unter 3.3.2. und 3.3.3. beschriebenen Parameter nur auf diese Blutproben näher eingegangen.

Der pH-Wert des Blutes erhöhte sich in den letzten beiden Blutproben der Schock-Pyruvat-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe signifikant (Abb. 21A). Alle

anderen Schutzstoffe hatten keinen signifikanten Effekt auf den arteriellen pH-Wert. Erwartungsgemäß bestätigte sich dieser Befund auch für den SBS in diesen Blutproben. In der Schock-Pyruvat-Gruppe konnte ein deutlich weniger negativer Wert gemessen werden als in allen anderen Schutzgruppen und der NaCl-Kontrollgruppe (Abb. 21B). Ebenfalls konnte ein Effekt in der Schock-Pyruvat-Gruppe auf die  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Blut beobachtet werden. Diese war in den letzten beiden Blutproben gegenüber der NaCl-Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 21C).



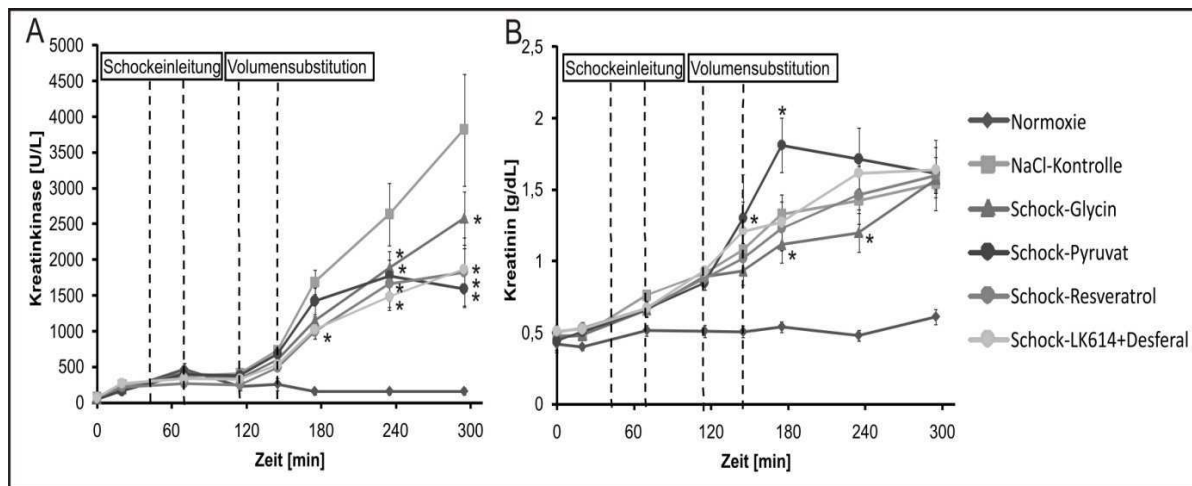
**Abb. 21:** Einfluss von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und LK 614 + Desferal auf den pH-Wert, den Säure-Basen-Status die  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration des Blutes nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. A) pH-Wert; B) Säure-Basen-Status; C)  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration. Alle Parameter wurden in frisch abgenommenem arteriellem Vollblut bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: R = Ringer-Lösung; SBS = Säure-Basen-Status.

Hinsichtlich des  $\text{O}_2$ - und  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks, der  $\text{O}_2$ -Sättigung, der Osmolalität, des Hämatokritwerts sowie der Konzentrationen von Hämoglobin,  $\text{K}^+$ -Ionen,  $\text{Na}^+$ -Ionen,

Ca<sup>2+</sup>-Ionen, Cl<sup>-</sup>-Ionen, Glukose und Laktat verursachten die Schutzstoffe keine signifikanten Effekte im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (nicht gezeigt).

### **3.3.3. Einfluss der Einzelschutzstoffe auf enzymatische Organschädigungsmarker und die Kreatininkonzentration im Blutplasma nach hämorrhagischem Schock**

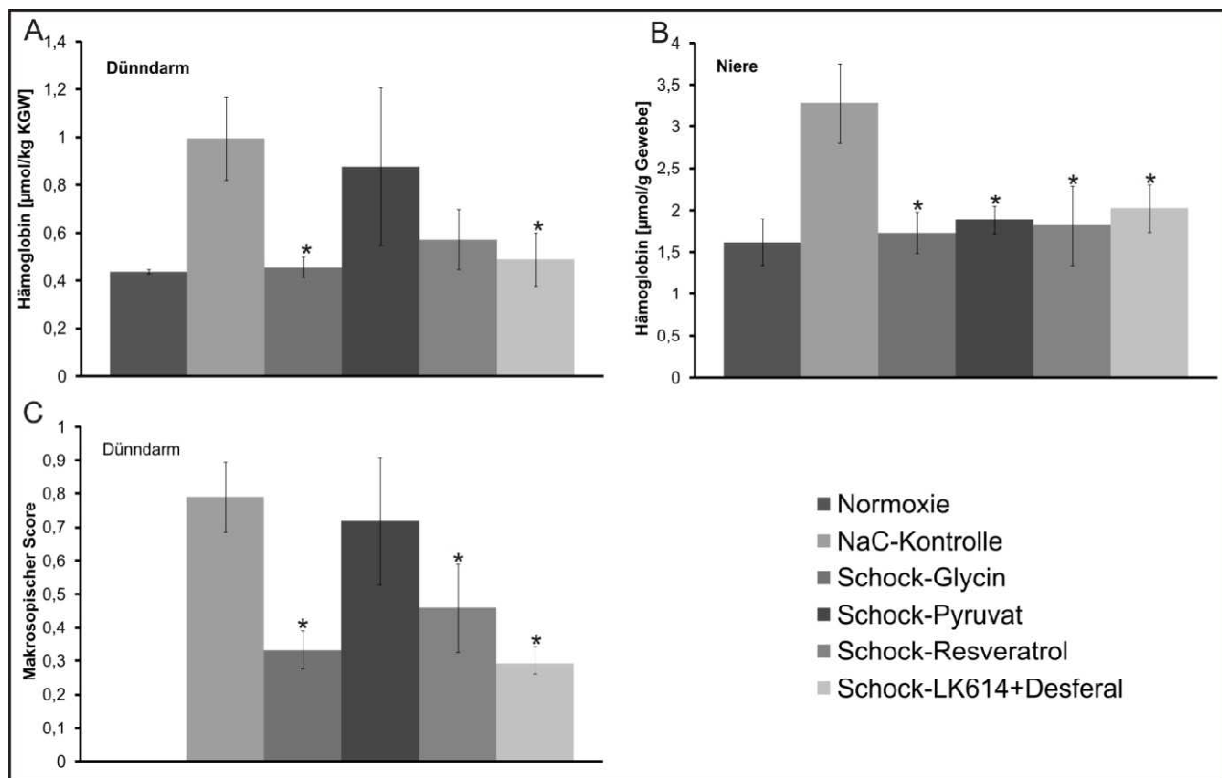
Signifikante und konstante Effekte durch die Schutzstoffe waren nur bezüglich der CK-Aktivität im Blut zu sehen. Der Anstieg der CK-Aktivität aller Schutzstoffgruppen verminderte sich in den letzten zwei Stunden des Versuchs signifikant im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (Abb. 22A). Hinsichtlich der Kreatininkonzentration im Blut gab es nur partielle Effekte durch die Schutzstoffe. Am Ende der therapeutischen Volumensubstitution und 30 Minuten danach zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Kreatininkonzentration durch Pyruvat (Abb 22B). Im weiteren Versuchsverlauf konnte diese Erhöhung jedoch nicht weiter beobachtet werden. Allerdings konnte in der Schock-Glycin-Gruppe eine verminderte Kreatininkonzentration für die 6. und 7. Blutprobe im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe beobachtet werden, die sich jedoch zum Ende des Versuches nicht mehr nachweisen ließ. Die Aktivitäten der ALAT, ASAT und LDH zeigten keine signifikanten, durch die Schutzstoffe verursachten Unterschiede zur NaCl-Kontrollgruppe (nicht gezeigt).



**Abb. 22:** Einfluss von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und LK 614 + Desferal auf die Kreatinkinaseaktivität und die Kreatininkonzentration im Plasma nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. A) Kreatinkinaseaktivität; B) Kreatininkonzentration. Die Parameter wurden im Blutplasma bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzung: R = Ringer-Lösung.

### 3.3.4. Einfluss der Einzelschutzstoffe auf die Histopathologie und andere Schädigungsmarker in den Organen nach hämorrhagischem Schock

In der Dünndarmwand bewirkten alle Schutzstoffe eine tendenziell verminderte Hämoglobinkonzentration. Hierbei waren jedoch nur die Unterschiede von Glycin und Deferoxamin + LK 614 zur NaCl-Kontrollgruppe signifikant, während Pyruvat und Resveratrol nur leichte, nicht signifikante Effekte verursachten (Abb. 23A). In der Niere waren für alle Schutzstoffgruppen signifikant niedrigere Hämoglobinkonzentrationen zu beobachten als in der NaCl-Kontrollgruppe (Abb. 23B). Im Lungengewebe führte ausschließlich Glycin zu einem deutlich verminderten Hämoglobingehalt, während in der Leber durch keinen der Schutzstoffe signifikante Effekte erzielt werden konnten (nicht gezeigt).



**Abb. 23:** Einfluss von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und LK 614 + Desferal auf den Hämoglobingehalt des Dünndarm- und Lungengewebes und die makroskopische Schädigung des Dünndarms nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. A) Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes; B) Hämoglobingehalt des Nierengewebes. Der Hämoglobingehalt wurde photometrisch im Überstand der Organhomogenate bestimmt. C) makroskopische Schädigung des Dünndarms. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: KGW = Körpergewicht; R = Ringer Lösung.

Die makroskopische Befundung des Dünndarms ergab eine signifikante Verminderung der Schädigung in der Schock-Glycin-, Schock-Resveratrol- und der Schock-Deferoxamin + LK 614-Gruppe. Glycin und Deferoxamin + LK 614 erreichten eine Verringerung der Schädigung auf 35% der Schädigung der NaCl-Kontrollgruppe, während Resveratrol die Schädigung auf knapp 50% reduzieren konnte (Abb. 23C). Wie schon hinsichtlich des Hämoglobingehalts gezeigt, konnte auch hier kein signifikanter Effekt für die Pyruvatgruppe beschrieben werden. Die histopathologische Befundung ergab für den Dünndarm eine verstärkte Schädigung in der Pyruvatgruppe im Vergleich zur NaCl-Kontrolle (Tab. 2). Durch alle anderen Schutzstoffe konnten keine Effekte erzielt werden. Hierbei muss allerdings angemerkt werden, dass die durch den hämorrhagischen Schock und die therapeutische Volumensubstitution hervorgerufene Schädigung äußerst gering war und somit mögliche Schutzeffekte kaum quantifizierbar waren.



	Normoxie	NaCl-Kontrolle	Schock-Glycin	Schock-Pyruvat	Schock-Resveratrol	Schock-Desferal+LK614
<b>Dünndarm</b>						
Park/Chiu-Score	0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	*1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1
<b>Niere</b>						
Blutgehalt Rinde [%]	4,3 ± 0,9	23,8 ± 2,6	*16,4 ± 1,7	18,6 ± 2,7	*14,3 ± 1,6	17,5 ± 3
Blutgehalt äußeres Mark [%]	7,1 ± 0,9	75,4 ± 6	*52,5 ± 8,4	*51,3 ± 9,2	*45 ± 8,7	69,3 ± 6,3
Blutgehalt inneres Mark [%]	5 ± 0,9	32,3 ± 3,5	*14,3 ± 2,6	*16,4 ± 2	*18,8 ± 2,8	*18,8 ± 3
eingebutete Glomeruli [%]	8,1 ± 1,4	51,2 ± 6,4	43,8 ± 6	*30 ± 4,6	*33,8 ± 4,2	45,6 ± 6,5
geschrumpfte Glomeruli [%]	1,7 ± 1	70 ± 6	*42,5 ± 6,5	51,3 ± 8,8	*41,3 ± 8,8	51,9 ± 6,4
Ablsg. BM Rinde [%]	0	17,7 ± 2,1	14,4 ± 2	18,8 ± 3,9	13,1 ± 1,6	13,8 ± 2,1
Ablsg. BM äußeres Mark [%]	4,3 ± 0,8	46,5 ± 6,7	27,1 ± 4,3	33,8 ± 7,3	*26,3 ± 8	48,1 ± 6,3
Ablsg. BM inneres Mark [%]	1,4	18,2 ± 1,2	23,8 ± 5,1	23,1 ± 4,1	16,3 ± 3,2	12,9 ± 1,4
<b>Leber</b>						
Einblutung Sinusoide [E/GF]	10,4 ± 1	16,7 ± 0,5	15,6 ± 0,8	15,1 ± 0,9	14,7 ± 0,7	14,1 ± 0,7
Granulozyten Infiltration [%]	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,4	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2
vakuolierte Hepatozyten [%]	57,7 ± 5,7	78,8 ± 1,9	*69,3 ± 2,9	*70,7 ± 2,2	76,1 ± 2	73,9 ± 2,2

**Tab. 2:** Einfluss von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und LK 614 + Desferal auf die Histologie des Dünndarms, der Niere und der Leber nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: Ablsg. = Ablösung; BM = Basalmembran; E = Erythrozyten; GF = Gesichtsfeld; R = Ringer-Lösung.

Bezüglich des Dünndarmgewichts, des Nass-Trocken-Gewichts des Dünndarms und des Lungengewichts gab es keine signifikanten Einflüsse durch die Schutzstoffe im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (nicht gezeigt).

Die histopathologischen Befunde der Niere stellten sich heterogen dar. So wurde durch den Einsatz von Glycin der Blutgehalt in der Nierenrinde und im Nierenmark, sowie die Schrumpfung der Glomeruli im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe signifikant reduziert, während in den anderen Parametern keine Wirkung zu erkennen war (Tab. 2). Ebenfalls signifikant vermindert wurde der Blutgehalt in der Nierenrinde und dem Nierenmark durch Resveratrol. Dieses bewirkte zusätzlich noch eine signifikant geringere Einblutung in die Glomeruli, verminderte deren Schrumpfung und reduzierte die Ablösung der Tubuluszellen von der Basalmembran im äußeren Nierenmark. Auch Pyruvat konnte den Blutgehalt der Glomeruli senken. Seine Wirkung auf das restliche Nierengewebe beschränkte sich jedoch auf das Mark, wo ebenfalls eine signifikante Verminderung des Blutgehalts erkennbar war. Die Eisenchelatoren konnten lediglich den Blutgehalt im inneren Nierenmark signifikant senken. In allen anderen Parametern der Nierenhistologie wichen sie nicht eindeutig von der NaCl-Kontrolle ab (Tab. 2).

In der Leber konnte lediglich eine verminderte Vakuolisierung der Hepatozyten im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe durch Glycin und Pyruvat festgestellt werden (Tab. 2).

Für Lunge und Herz wurden keine histologischen Veränderungen durch den Schock und die Volumensubstitution erkennbar. Demzufolge konnten auch keine

Schutzeffekte erzielt werden (nicht gezeigt). Negative Effekte der Schutzstoffe auf die Lungen- und Herzhistologie wurden nicht beobachtet.

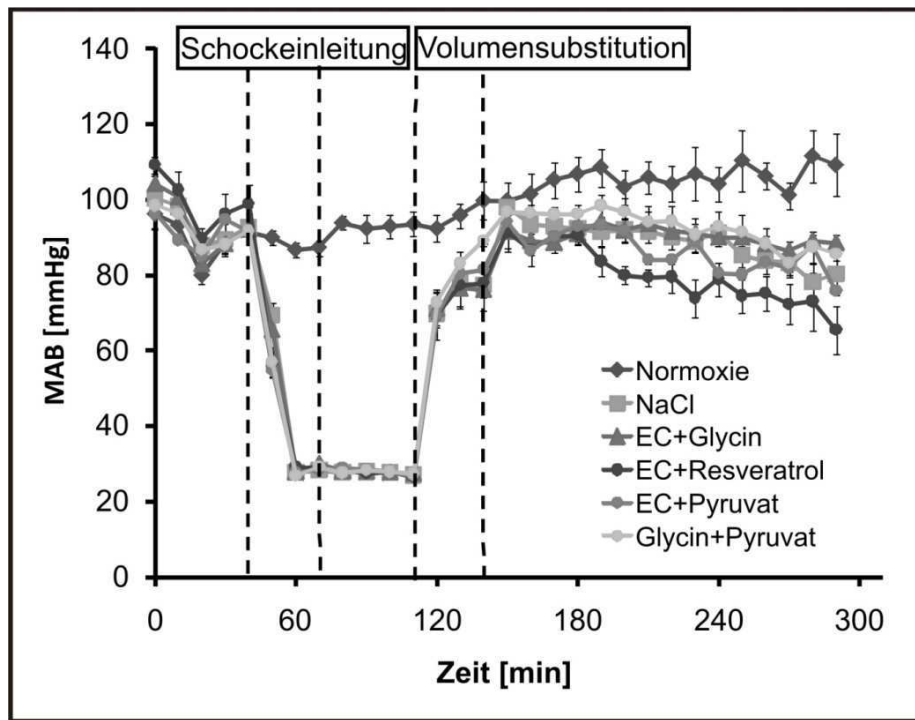
Die Ergebnisse für die Parameter des Blutbildes und der Gerinnungsparameter waren sehr heterogen. Es gab für keinen der gemessenen Parameter einen signifikanten Effekt der Schutzstoffe im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (nicht gezeigt).

### **3.4. Ergebnisse der Versuchsserie zur Protektion durch die Kombinationen der Schutzstoffe**

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorausgegangenen Versuchsserie wurden in dieser Serie die Kombinationen Eisenchelatoren (= Deferoxamin + LK614) + Glycin, Eisenchelatoren + Resveratrol, Eisenchelatoren + Pyruvat sowie Glycin + Pyruvat auf ihre protektives Potential hin untersucht. Insbesondere wurde dabei auf mögliche synergistische Effekte der Schutzstoffe in den Kombinationslösungen im Vergleich zu den Einzelschutzstoffen geachtet.

#### **3.4.1. Einfluss von Schutzstoffkombinationen auf die Vitalparameter nach hämorrhagischem Schock**

Die Verläufe von MAB, Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körpertemperatur für die Schutzstoffkombinationsgruppen sind weitestgehend deckungsgleich zu denen der Einzelschutzstoffe. Nur für die Eisenchelatoren + Resveratrolgruppe zeigte sich ein deutliches Absinken des MAB nach der Volumensubstitution bis hin zum Versuchsende (bis auf ca. 65mmHg) (Abb. 24).

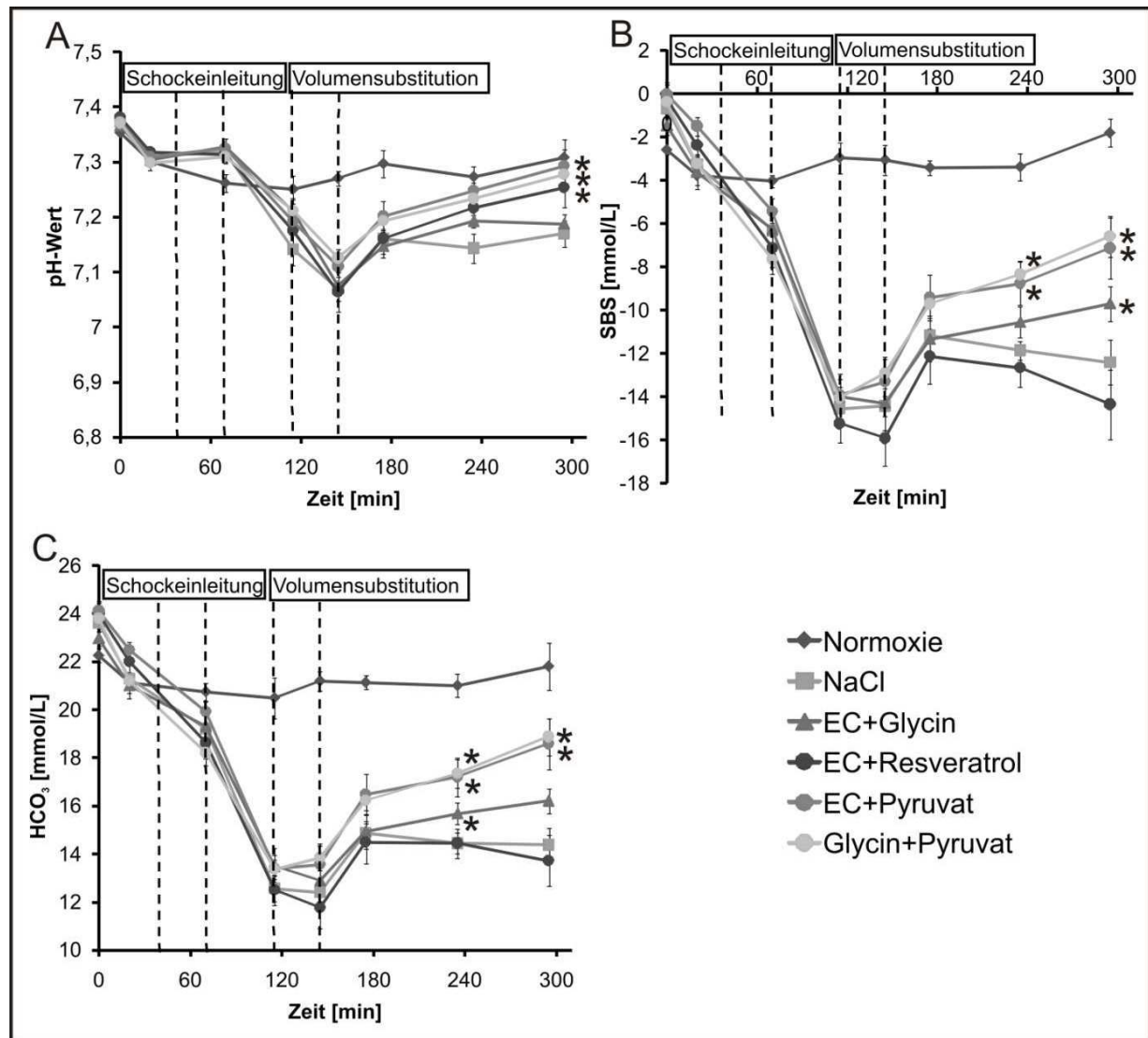


**Abb. 24:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf den mittleren arteriellen Blutdruck nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. Abkürzungen: EC = LK 614 + Desferal; MAB = mittlerer arterieller Blutdruck.

### 3.4.2. Einfluss von Schutzstoffkombinationen auf die Blutgasanalyse, Elektrolytkonzentrationen und metabolische Parameter nach hämorrhagischem Schock

Wie nach den Ergebnissen aus der vorausgegangenen Versuchsserie (Abb. 21A, B) zu erwarten war, zeigten sich am Versuchsende im Blut der Tiere, die Pyruvat erhielten, ein deutlich höherer pH-Wert und SBS als in den Versuchsgruppen, die während der Volumensubstitution kein Pyruvat erhielten. Davon ausgenommen ist der pH-Wert der Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe. Hier war der pH-Wert ebenfalls signifikant erhöht, was sich erstaunlicherweise allerdings nicht im SBS dieser Gruppe widerspiegelte (Abb. 25A, B). Ebenfalls, die Ergebnisse der Vorserie bestätigend, sorgten die Kombinationslösungen mit Pyruvat für einen deutlichen Anstieg der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Blut zum Versuchsende hin, während die Werte für die anderen Kombinationslösungen nur leicht anstiegen (Eisenchelatoren + Glycin) oder leicht abfielen (Eisenchelatoren + Resveratrol) (Abb. 25C). Ähnliches

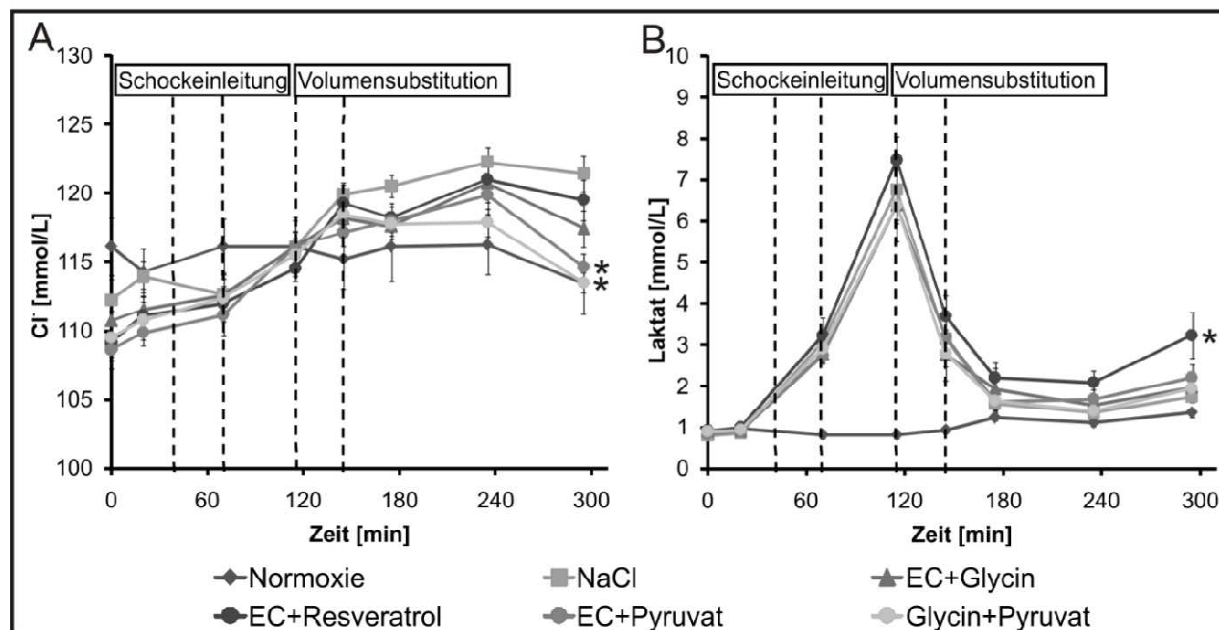
hatte sich auch für die Schock-Pyruvat-Gruppe in der vorausgegangenen Serie gezeigt, jedoch gab es keine signifikante Veränderung des pH-Werts und des SBS der Kombinationslösungen, die Pyruvat enthielten, im Vergleich zu Pyruvat als Einzelschutzstoff (Abb. 21C).



**Abb. 25:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf den pH-Wert, den Säure-Basen-Status und die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration im Blut nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. A) pH-Wert; B) Säure-Basen-Status; C) HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration. Die Parameter wurden in frisch abgenommenem arteriellem Vollblut bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: EC = LK 614 + Desferal; SBS = Säure-Basen-Status.

Hinsichtlich der Konzentration von Cl<sup>-</sup>-Ionen im Blut fällt auf, dass alle Schutzstoffkombinationslösungen, verglichen mit den Einzelschutzstoffen (nicht gezeigt), tendenziell zu einer Absenkung des Cl<sup>-</sup>-Spiegels nach der therapeutischen Volumensubstitution führten (Abb. 26A). Insbesondere die Kombinationslösungen,

die Pyruvat enthielten, senkten den Gehalt an  $\text{Cl}^-$  im Blut deutlich ab. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist der isoosmotische Ansatz der Schutzstofflösungen. Die Kombinationslösungen mit Pyruvat enthalten deutlich mehr Aqua bidest. und somit weniger  $\text{Cl}^-$ -Ionen als die anderen Kombinationslösungen (siehe 2.2.5.4.) und könnten deshalb für das Absinken der  $\text{Cl}^-$ -Ionen Konzentration verantwortlich sein.



**Abb. 26:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf die  $\text{Cl}^-$ - und Laktatkonzentration im Blut nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. A)  $\text{Cl}^-$ -Konzentration; B) Laktatkonzentration. Alle Parameter wurden in frisch abgenommenem arteriellem Vollblut bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: EC = LK 614 + Desferal.

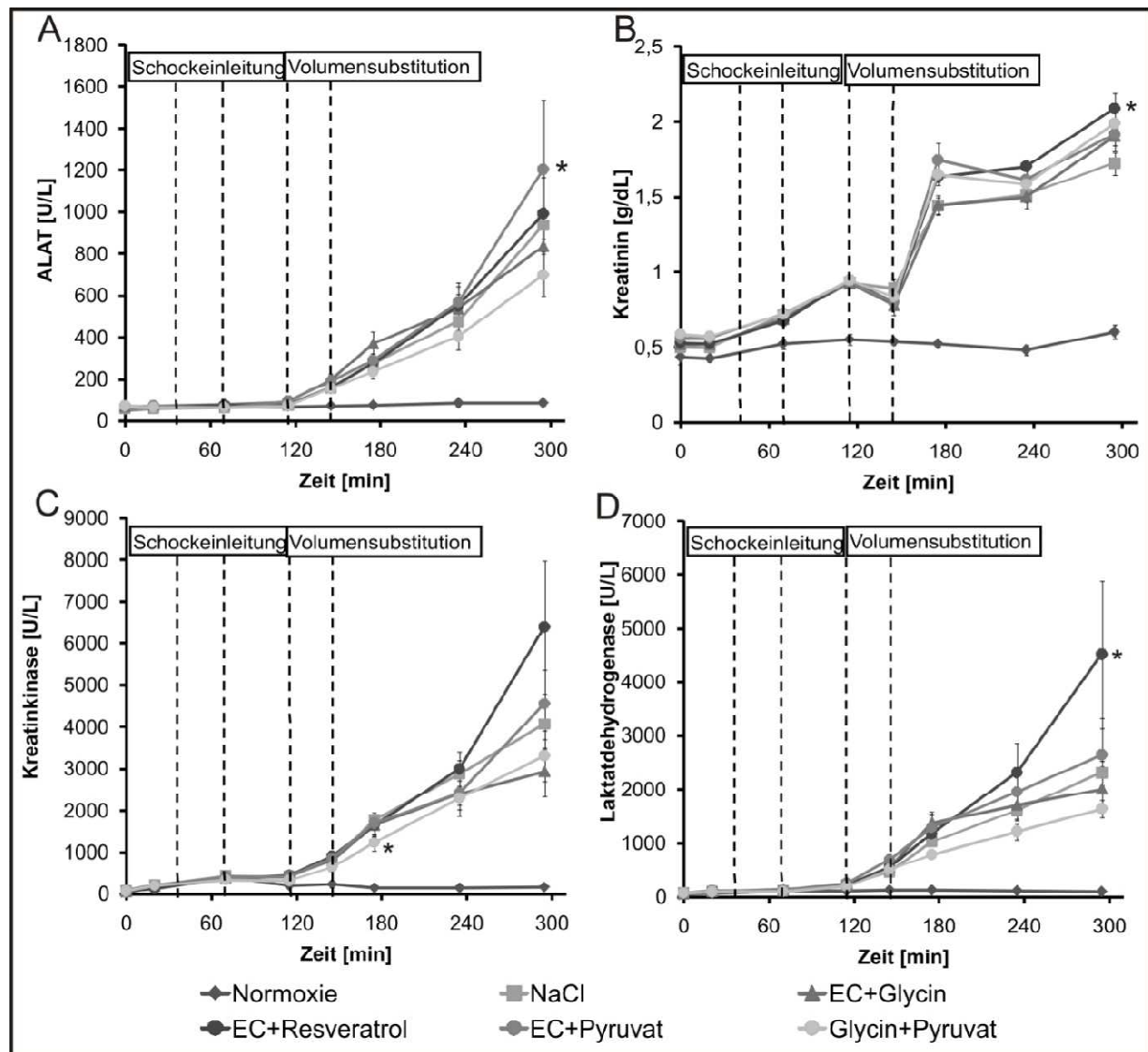
Die Laktatkonzentration im Blut war am Ende des Versuchs in der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe signifikant erhöht gegenüber allen anderen Kombinationslösungen (Abb. 26B) der NaCl-Kontrolle sowie den Einzelschutzstoffen Resveratrol und Deferoxamin + LK614 (nicht gezeigt). Dies könnte auf eine besonders starke Schädigung der Leber in dieser Gruppe und den damit verbundenen eingeschränkten Abbau von Laktat hindeuten und bestätigt sich durch die hohe Aktivität der ALAT (Abb. 27A).

Bezüglich des  $\text{O}_2$ - und  $\text{CO}_2$ -Partialdruck, der  $\text{O}_2$ -Sättigung, der Osmolalität, des Hämatokritwerts sowie für die Konzentrationen von Hämoglobin,  $\text{K}^+$ -Ionen,  $\text{Na}^+$ -

Ionen,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Glukose verursachten die Schutzstoffkombinationen keine signifikanten Effekte im Vergleich zu den Einzelschutzstoffen (nicht gezeigt).

### **3.4.3. Einfluss von Schutzstoffkombinationen auf enzymatische Organschädigungsmarker und die Kreatininkonzentration im Blutplasma nach hämorrhagischem Schock**

Hinsichtlich dieser Gruppe von Parametern waren die Ergebnisse in dieser Serie sehr heterogen. Während für die ALAT Aktivität im Plasma eine signifikante Erhöhung der Werte in den Gruppen Schock-Eisenchelatoren + Glycin (im Vergleich zu den Einzelschutzstoffgruppen) und Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol (im Vergleich zur NaCl-Kontrolle und den Einzelschutzstoffgruppen) am Versuchsende zu beobachten war (Abb. 27A), gab es für ASAT keinerlei signifikante Abweichungen der Kombinationsgruppen zu den Einzelschutzstoffgruppen oder der NaCl-Kontrolle (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten tendenziell auf eine schädigende Wirkung durch Eisenchelatoren + Resveratrol und eine verminderte Schutzwirkung durch Eisenchelatoren + Glycin bezüglich der Leberfunktion hin. Für die anderen Kombinationslösungen gibt es keine Hinweise auf eine verbesserte Leberfunktion im Vergleich zu den Einzelsubstanzen.



**Abb. 27:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf auf Enzymaktivitäten und die Kreatininkonzentration im Plasma nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. A) Alanin-Aminotransferaseaktivität; B) Kreatininkonzentration; C) Kreatinkinaseaktivität; D) Laktatdehydrogenaseaktivität. Die Parameter wurden im Blutplasma bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: ALAT = Alanin-Aminotransferaseaktivität; EC = LK 614 + Desferal.

Während die Kreatininkonzentration im Plasma für alle Kombinationslösungen direkt nach der Volumensubstitution tendenziell noch unter dem Niveau der Einzelschutzstoffe lag, war sie am Versuchsende für die Kombinationslösungen tendenziell höher als für die Einzelschutzstoffe (Abb. 27B; vgl. Abb. 22B). In den Gruppen Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol und Schock-Glycin + Pyruvat zeigten sich zu diesem Zeitpunkt sogar signifikant erhöhte Kreatininkonzentrationen im Vergleich zu den Einzelschutzstoffen und in der Schock-Eisenchelatoren +

Resveratrol-Gruppe auch im Vergleich zur NaCl-Kontrolle. Diese Ergebnisse deuten tendenziell auf eine schädigende Wirkung durch Eisenchelatoren + Resveratrol und eine verminderte Schutzwirkung durch Glycin + Pyruvat bezüglich der Nierenfunktion hin. Für die anderen Kombinationslösungen gibt es keine Hinweise auf eine verbesserte Nierenfunktion im Vergleich zu den Einzelsubstanzen.

Ähnliche Ergebnisse waren für die CK-Aktivität im Blut zu beobachten. Hier waren die Werte der Kombinationslösungen jedoch schon nach der therapeutischen Volumensubstitution tendenziell höher als die der Einzelsubstanzen (Abb. 27C vgl. Abb. 22A). Zum Ende des Versuchs fallen besonders die signifikant erhöhten Werte der Gruppen Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol (im Vergleich zur NaCl-Kontrolle und den Einzelschutzstoffgruppen) und Schock-Eisenchelatoren + Pyruvat (im Vergleich zu den Einzelschutzstoffgruppen) auf. Diese Ergebnisse deuten tendenziell auf eine schädigende Wirkung durch Eisenchelatoren + Resveratrol und eine verminderte Schutzwirkung durch Eisenchelatoren + Pyruvat bezüglich der Muskulatur hin. Für die anderen Kombinationslösungen gibt es keine Hinweise auf einen verbesserten Schutz der Muskulatur im Vergleich zu den Einzelsubstanzen.

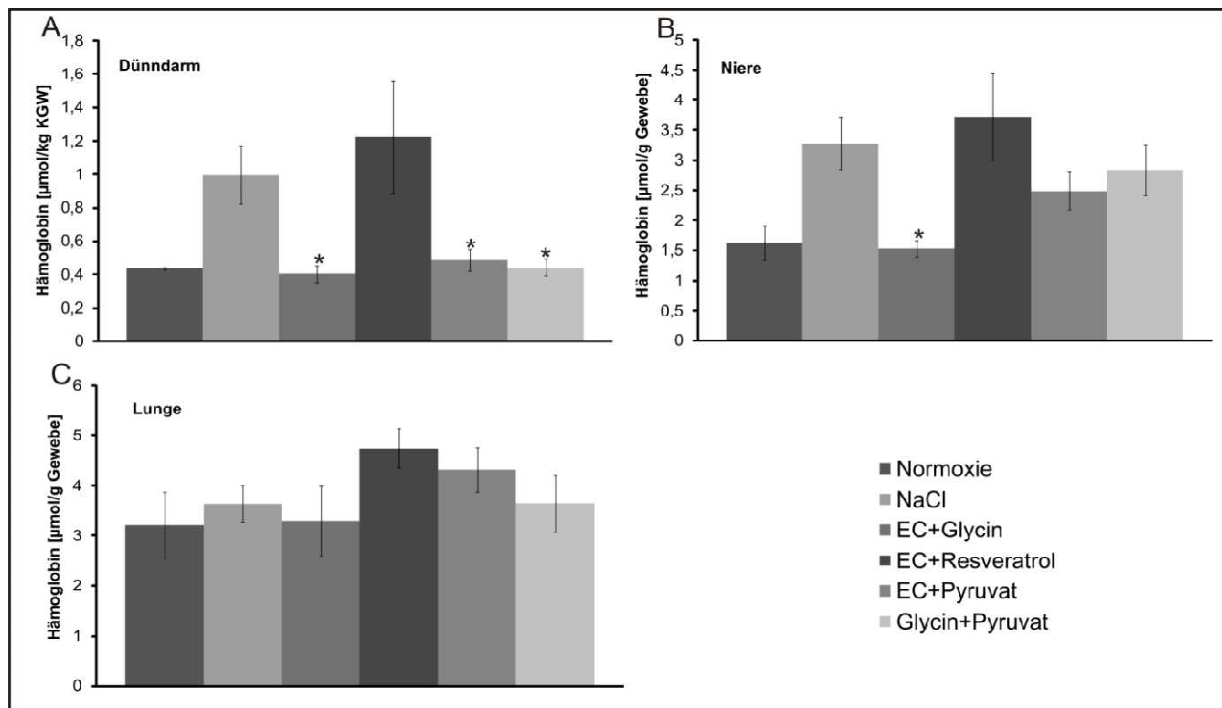
Ebenfalls signifikant erhöht war die LDH-Aktivität in der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe am Ende des Versuchs (Abb. 27D). Für die anderen Gruppen und Zeitpunkte traten keine Besonderheiten im Vergleich mit den Einzelschutzstoffen und der NaCl-Kontrollgruppe auf.

#### **3.4.4. Einfluss von Schutzstoffkombinationen auf die Histopathologie und andere Schädigungsmarker in den Organen nach hämorrhagischem Schock**

Im Dünndarm war die Hämoglobinkonzentration für alle Kombinationslösungen, außer der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe, im Vergleich zur NaCl-Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 28A vgl. Abb. 23A). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem der Einzelsubstanzen, die ebenfalls tendenziell (Resveratrol) oder signifikant (Glycin und LK 614 + Desferal) eine Senkung der Hämoglobinkonzentration im Dünndarm bewirkten. Signifikante synergistische Effekte der Schutzstoffkombinationen traten nicht auf. Eine Absenkung der

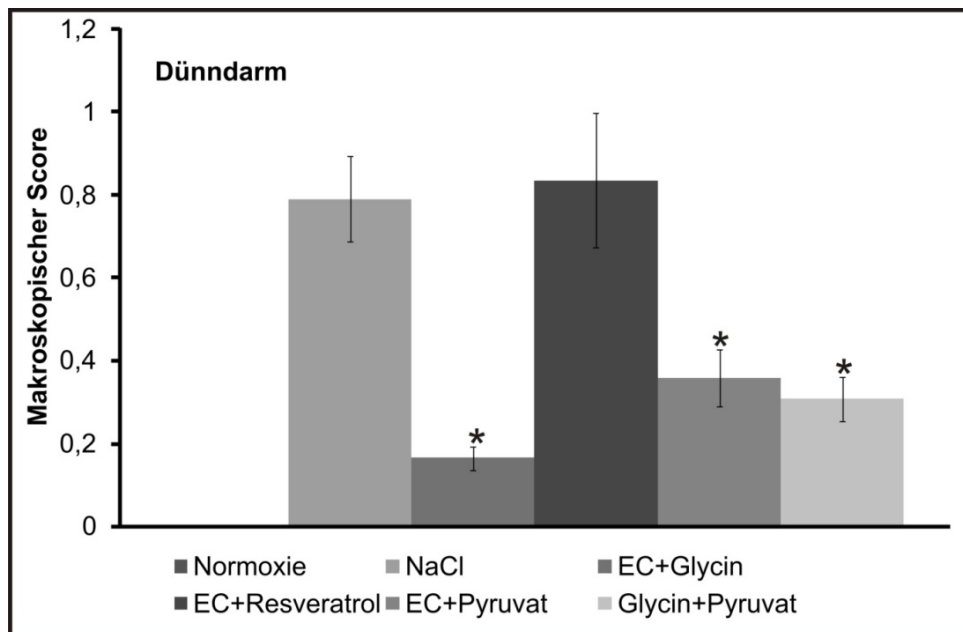


Hämoglobinkonzentration in der Niere, bis auf das Niveau der normoxischen Kontrollgruppe, konnte für die Schock-Eisenchelatoren + Glycin-Gruppe beobachtet werden (Abb. 28B). Die anderen Kombinationslösungen verursachten im Vergleich zur NaCl-Kontrolle keinen signifikanten Effekt und verglichen mit den Einzelsubstanzen tendenziell eher erhöhte Hämoglobinkonzentrationen in der Niere (Abb. 28B vgl. Abb. 23B). Während für die Hämoglobinkonzentration in der Leber keine der Kombinationslösungen einen Effekt gegenüber den Einzelschutzstoffen erzielte (nicht gezeigt), zeigten sich in der Lunge signifikant erhöhte Hämoglobinkonzentrationen für die Gruppen Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol, Schock-Eisenchelatoren + Pyruvat und Schock-Glycin + Pyruvat im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsubstanzen (nicht gezeigt), jedoch nicht gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe (Abb. 28C). Bezüglich der Hämoglobinkonzentration in den Organgeweben konnten keine positiven Effekte der Schutzstoffkombinationen im Vergleich zu den Einzelschutzstoffen festgestellt werden. In der Lunge scheinen die Kombinationen Eisenchelatoren + Resveratrol, Eisenchelatoren + Pyruvat und Glycin + Pyruvat im Vergleich zu den Einzelschutzstoffen sogar eher schädigend zu wirken.



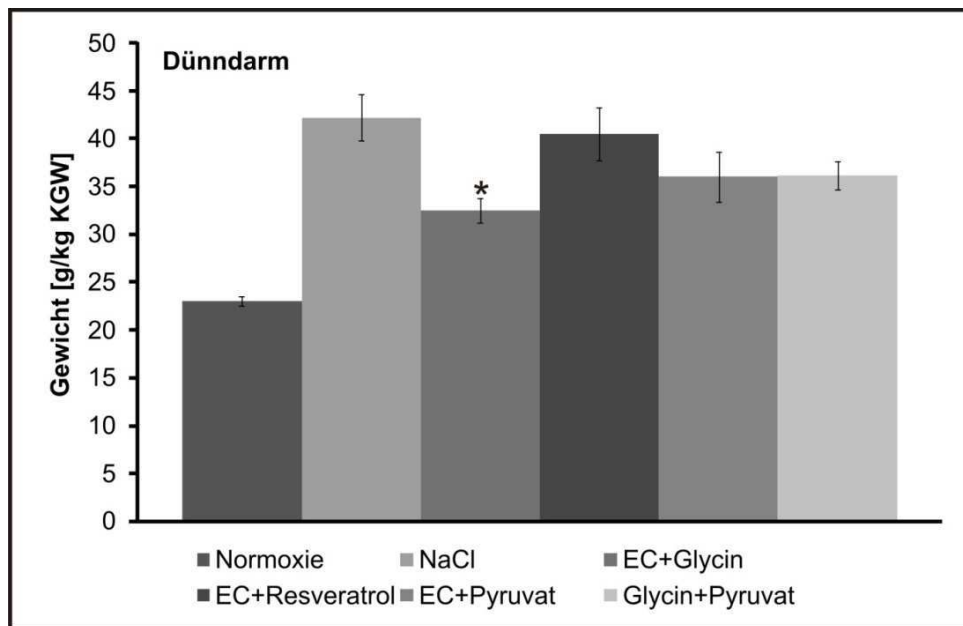
**Abb. 28:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf den Hämoglobingehalt des Dünndarm-, Nieren- und Lebergewebes nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. A) Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes; B) Hämoglobingehalt des Nierengewebes; C) Hämoglobingehalt des Lungengewebes. Der Hämoglobingehalt wurde photometrisch im Überstand der Organhomogenate bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: EC = LK 614 + Desferal; KGW = Körpergewicht.

Außer in der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe war für alle Kombinationslösungen eine signifikant verminderte makroskopische Schädigung des Dünndarms im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe festzustellen (Abb. 29). Am eindeutigsten fiel dieser protektive Effekt für die Schock-Eisenchelatoren + Glycin-Gruppe aus. Im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsubstanzen war der einzige Effekt, dass die Schädigung in der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol Gruppe verglichen mit der Schock-Resveratrol-Gruppe erhöht war (Abb. 29, vgl. Abb. 23C). Alle anderen Kombinationslösungen bewirkten, im Vergleich mit den jeweiligen Einzelsubstanzen, keine eindeutigen synergistischen Effekte.



**Abb. 29:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf die makroskopische Schädigung des Dünndarms nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: EC = LK 614 + Desferal.

Hinsichtlich des Dünndarmgewichts konnten gleich zwei Effekte beobachtet werden. Zum einen wogen die Dünndärme der Schock-Eisenchelatoren + Glycin Gruppe signifikant weniger als die der NaCl-Gruppe (Abb. 30), zum anderen war das Dünndarmgewicht für beide Kombinationslösungen mit Pyruvat deutlich geringer als für Pyruvat allein (nicht gezeigt), was auf eine deutlich verminderte Transsudation von Plasma in das Dünndarmlumen in diesen Gruppen hindeutet. Für das Nass-Trocken-Gewicht des Dünndarms und das Lungengewicht gab es keine Effekte der Kombinationslösungen, weder im Vergleich zur NaCl-Kontrolle, noch zu den Einzelsubstanzen (nicht gezeigt). Die histologisch sichtbare Schädigung des Dünndarms durch den hämorrhagischen Schock und die therapeutische Volumensubstitution war sehr gering und somit ließen sich mögliche Schutzeffekte nur schwer quantifizieren. Trotzdem ließen sich eine stärkere histologische Schädigung für die Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe sowie eine tendenziell verminderte Schädigung in der Schock-Eisenchelatoren + Glycin-Gruppe und der Schock-Glycin + Pyruvat-Gruppe, jeweils im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe, beobachten. Die Schock-Eisenchelatoren + Pyruvat-Gruppe zeigte zwar eine signifikant verminderte Schädigung im Vergleich zur Pyruvatgruppe, nicht jedoch im Verhältnis zur NaCl-Kontrolle (Tab. 3, vgl. Tab. 2).



**Abb. 30:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf das Gewicht des Dünndarms nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. Die Wägung erfolgte unmittelbar nach der Organentnahme. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: EC = LK 614 + Desferal; KGW = Körpergewicht.

Signifikante Unterschiede der Kombinationslösungen zu den Einzelschutzstoffen für die histologische Befundung der Niere gab es bezüglich der Ablösung der Tubulizellen von der Basalmembran im inneren Nierenmark. Hier war die Ablösung in der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe höher als in der Schock-Resveratrol- und Schock-LK614 + Desferal-Gruppe (Tab. 3, vgl. Tab. 2). Zusätzlich ergaben sich noch signifikante Abweichungen von der NaCl-Kontrollgruppe. So reduzierte sich in der Schock-Glycin + Pyruvat-Gruppe der Blutgehalt in allen Nierengewebe signifikant. Zusätzlich war der Blutgehalt in der Nierenrinde, dem äußeren Nierenmark und den Glomeruli sowie deren Schrumpfung für die Schock-Eisenchelatoren + Glycin-Gruppe vermindert. Außerdem sorgte die Kombination von Eisenchelatoren + Pyruvat im äußeren Nierenmark sowie in den Glomeruli für einen reduzierten Blutgehalt und verminderte überdies die Schrumpfung der Glomeruli. Insgesamt ließen sich in der Nierenhistologie für alle Kombinationsgruppen, außer der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe, deutliche protektive Effekte im Vergleich zur NaCl-Kontrolle, jedoch kaum synergistische Effekte der Kombinationslösungen feststellen (Tab. 3, vgl. Tab. 2).

	Normoxie	NaCl-Kontrolle	EC + Glycin	EC + Resveratrol	EC + Pyruvat	Glycin + Pyruvat
<b>Dünndarm</b>						
Park/Chiu-Score	0	0,2 ± 0,1	0	★1,1 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,1
<b>Niere</b>						
Blutgehalt Rinde [%]	4,3 ± 0,9	23,8 ± 2,6	★15 ± 1,7	17,1 ± 2,9	21,9 ± 3,8	★12,5 ± 2,1
Blutgehalt äußeres Mark [%]	7,1 ± 0,9	75,4 ± 6	★59,2 ± 10	60,6 ± 10,5	★46,3 ± 9,4	★32,9 ± 5,3
Blutgehalt inneres Mark [%]	5 ± 0,9	32,3 ± 3,5	25 ± 4,8	29,4 ± 5,6	23,1 ± 5,2	★13,8 ± 3,1
eingebtete Glomeruli [%]	8,1 ± 1,4	51,2 ± 6,4	★33,3 ± 3,6	44,4 ± 8,1	★32,1 ± 3	★33,1 ± 8,6
geschrumpfte Glomeruli [%]	1,7 ± 1	70 ± 6	★51,7 ± 10,8	51,9 ± 8,2	★43,8 ± 7,1	★41,9 ± 10,9
Ablsg. BM Rinde [%]	0	17,7 ± 2,1	21 ± 2,4	12,9 ± 2,5	12,5 ± 3,7	11,4 ± 3,2
Ablsg. BM äußeres Mark [%]	4,3 ± 0,8	46,5 ± 6,7	47,5 ± 11,5	45 ± 7,1	37,5 ± 9,7	34,4 ± 8,8
Ablsg. BM inneres Mark [%]	1,4	18,2 ± 1,2	18,3 ± 3,2	★35,6 ± 10,3	20 ± 1,8	18,8 ± 4
<b>Leber</b>						
Einblutung Sinusoide [E/GF]	10,4 ± 1	16,7 ± 0,5	20,2 ± 4,4	16,8 ± 1	14,7 ± 1,6	12,4 ± 1,1
Granulozyten Infiltration [%]	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1	★0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	★0,4 ± 0,1	1 ± 0,2
vakuolierte Hepatozyten [%]	57,7 ± 5,7	78,8 ± 1,9	77,2 ± 3,3	★68,5 ± 4,9	81,9 ± 2,9	83,6 ± 2,4

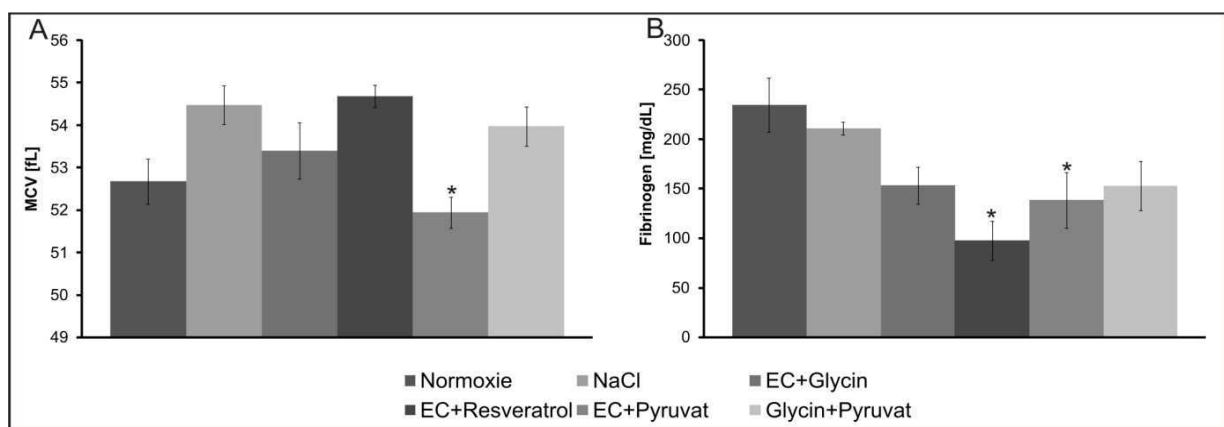
**Tab. 3:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf die Histologie des Dünndarms, der Niere und der Leber nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: Ablsg. = Ablösung; BM = Basalmembran; E = Erythrozyten; EC = LK 614 + Desferal; GF = Gesichtsfeld.

Für die Leber gab es bezüglich der Erythrozyten im Gewebe eine signifikante Erhöhung in der Schock-Eisenchelatoren + Glycin Gruppe im Vergleich zur Eisenchelatoren Gruppe, während für die entzündlichen Infiltrate im Lebergewebe zwar einige signifikante Unterschiede auftraten, jedoch die absoluten Unterschiede zwischen den Gruppen so gering waren (0,2-1%), dass eine wissenschaftlich fundierte Aussagekraft nicht gegeben war. In den Hepatozyten zeigte sich eine verminderte Vakuolisierung in der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Kontrolle sowie eine verstärkte Vakuolisierung für die Schock-Eisenchelatoren + Pyruvat Gruppe und die Schock-Glycin + Pyruvat Gruppe im Vergleich zu den Einzelstoffen Glycin und Pyruvat (Tab. 3 vgl. Tab. 2).

Die histologische Befundung der Lunge und des Herzens ergab keinerlei Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (nicht gezeigt).

In dieser Versuchsserie konnten erstmals signifikante Effekte auf das mittlere Zellvolumen der Erythrozyten und den Fibrinogengehalt des Blutes festgestellt werden. So war das mittlere Volumen der Erythrozyten in den Kombinationsgruppen tendenziell niedriger als mit den jeweiligen Einzelschutzstoffen, für die das mittlere Erythrozytenvolumen größer war als in der NaCl-Kontrolle (nicht gezeigt). Die Werte der Kombinationsgruppen hingegen lagen im Bereich zwischen der NaCl-Kontrolle und der normoxischen Kontrollgruppe, im Falle der Schock-Eisenchelatoren + Pyruvat-Gruppe sogar unter den Werten der normoxischen Kontrolle (Abb. 31A). Der Fibrinogengehalt des Blutes in der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe

war deutlich niedriger als in allen anderen Gruppen, einschließlich der NaCl- und der normoxischen Kontrollgruppe (Abb. 31B). Dies deutet auf eine verstärkte Umsetzung von Fibrinogen zu Fibrin in der Schock-Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe hin, was wiederum als deutlicher Hinweis auf eine Gerinnungsaktivierung gewertet werden kann. Zwar zeigt die Schock-Eisenchelatoren + Pyruvat-Gruppe ebenfalls eine signifikante Verminderung des Fibrinogengehalts im Vergleich zur NaCl-Kontrolle, jedoch ist die Abnahme im Vergleich zur Schock-Eisenchelatoren + Glycin-Gruppe und der Schock-Glycin + Pyruvat-Gruppe äußerst gering. Diese beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur NaCl-Kontrolle oder den Einzelschutzstoffen.



**Abb. 31:** Einfluss der Schutzstoffkombinationen EC + Glycin, EC + Resveratrol, EC + Pyruvat und Glycin + Pyruvat auf auf das mittlere Erythrozytenvolumen und den Fibrinogengehalt des Blutes nach schwerem hämorrhagischen Schock und therapeutischer Volumensubstitution mit R + Blut. A) Mittleres Erythrozytenvolumen. B) Fibrinogengehalt des Blutes. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Normoxie: n=8; NaCl-Kontrolle: n=8; alle Schutzstoffgruppen: n=8). Die Schockdauer betrug 45 Minuten. \*p < 0,05 vs. NaCl-Kontrolle. Signifikanzen der normoxischen Gruppe wurden nicht markiert. Abkürzungen: EC = LK 614 + Desferal; MCV = mittleres Erythrozytenvolumen.

## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges, gut reproduzierbares und realistisches Rattenmodell des schweren hämorrhagischen Schocks etabliert. An diesem Modell konnte gezeigt werden, dass Ringer-Lösung zur Volumensubstitution nach schwerem hämorrhagischen Schock besser geeignet ist als Ringer-Laktat-Lösung. Des Weiteren wurde entdeckt, dass Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Deferoxamin + LK 614 in diesem Modell einen protektiven Effekt auf den Dünndarm (kein Schutz durch Pyruvat), die Leber und insbesondere die Niere haben. Durch die Kombination verschiedener Einzelstoffe konnten jedoch kaum synergistische Schutzeffekte erzielt werden.

### 4.1. Tiermodell und Methodik

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen die gelungene Etablierung eines schweren aber gleichzeitig gut reproduzierbaren und klinisch relevanten Modells des hämorrhagischen Schocks an Ratten. Während und nach der 45 bzw. 60 minütigen Schockphase kam es zu deutlichen Organschädigungen, die sowohl histologisch als auch anhand der Freisetzung von Markerenzymen (siehe 2.2.7.) erfasst werden konnten. Ratten, die RL + Blut zur therapeutischen Volumensubstitution erhielten, überlebten zuverlässig die gesamte Versuchsdauer, während solche, die nur RL erhielten vorzeitig starben.

In früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen wurden bereits zahlreiche Tiermodelle für Untersuchungen zum hämorrhagischen Schock und der therapeutischen Volumensubstitution etabliert (Alkan, Eroglu et al. 2006; Greiffenstein, Mathis et al. 2007). In keinem dieser Modelle ist jedoch die Kombination aus einem lebensbedrohlich schweren Schock, einer hohen Reproduzierbarkeit des Modells und der klinischen Relevanz konsequent realisiert worden. In vielen Modellen wurde zwar ein schwerer Schock mit einem MAB von 30-35 mmHg eingestellt (Russell, Barreto et al. 1995; Zhong, Enomoto et al. 1999; Yang, Harada et al. 2006), jedoch entsprechen die langen Schockzeiten von zwei Stunden und länger nicht der Notfallmedizinischen Realität in industrialisierten Ländern. Ebenso ist ein schwerer

Schock (25-30 mmHg) von nur 20 Minuten (Stein, Hinder et al. 1990) klinisch nicht realistisch, wohingegen bei einer Schockdauer von 60 Minuten bei einem MAB von 45 mmHg (Hoppen, Corso et al. 2005) nicht von einem sehr schweren hämorrhagischen Schock gesprochen werden kann.

Zusätzlich zur maximalen und lebensbedrohlichen Schwere des Schocks, orientiert sich das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Modell sehr eng an der klinischen Realität. Die Schockeinleitung über 30 Minuten, die Schockdauer von 45 bzw. 60 Minuten und die Volumensubstitution über 30 Minuten entsprechen den klinischen Zeitverläufen der meisten Notfallsituationen in Deutschland (Hußmann, Taeger et al. 2011).

Die Gabe von Anästhetika und Analgetika kann die Folgen des hämorrhagischen Schocks und eines Traumas deutlich beeinflussen (Majde 2003; Lomas-Niera, Perl et al. 2005; Bahrami, Benisch et al. 2011). In der Klinik werden im hämorrhagischen Schock nach Trauma oft Isofluran oder Ketamin-Xylazin verabreicht. Ketamin scheint dabei ein ideales Notfallanalgetikum zu sein, da es eine kreislaufstabilisierende Wirkung hat (Sih, Campbell et al. 2011). Es ergänzt sich gut mit Isofluran, das in Notfallsituationen als Inhalationsanästhetikum eingesetzt wird (Pfenninger, Nicolai et al. 2010). In Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit stellte sich Xylazin als blutdrucksenkend heraus, weshalb es in den durchgeführten Versuchsserien nicht verwendet wurde (Rönn, T., Lendemanns, S., de Groot H., Petrat F. (2010); nicht publizierte Daten). Darüber hinaus wurden auch keine Opiate, die klinisch häufig appliziert werden, eingesetzt, da diese die Darmperistaltik reduzieren und somit die Schädigung des Darms beeinflussen können (Fox und Daniel 1987). Zudem wurde für einige Opiate bereits eine Gewebeprotektion vor den Folgen der Ischämie und Reperfusion nachgewiesen (Tubbs, Porcaro et al. 2002), die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber nicht erwünscht war, da sie die Effekte der eingesetzten Volumensubstitutionslösungen und Schutzstoffe überlagern könnten. Durch die Verwendung von Ketamin und Lidocain konnte die erforderliche Isofluran-Dosis reduziert und so der hypotensive Einfluss des Isoflurans minimiert werden.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit überlebten die Tiere zuverlässig eine hämorrhagische Schockphase von 45 bzw. 60 Minuten bei einem MAB von 25-30 mmHg. In Vorversuchen mit einem MAB von weniger als 25 mmHg konnte kein reproduzierbares Überleben der Schockphase gewährleistet werden. Bei einem MAB



oberhalb von 30 mmHg traten zum Einen kaum noch histologisch erfassbare Organschädigungen auf und waren zum Anderen häufig zusätzliche Blutabnahmen während der Schockphase nötig, da der Blutdruck während dieser aufgrund autoregulativer Mechanismen meist wieder anstieg (Rönn, T., Lendemans, S., de Groot H., Petrat F. (2010); nicht publizierte Daten). Dadurch wurde die Reproduzierbarkeit des Modells deutlich eingeschränkt. Ein möglichst schweres aber dennoch reproduzierbares hämorrhagisches Schockmodell der Ratte sollte demnach, wie das hier beschriebene Modell, auf einem Blutdruckbereich von 25-30 mmHg basieren.

Die konstante Infusion von 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung/kg KGW x Stunde war nötig, um Flüssigkeitsverluste über die respiratorischen Epithelien und Operationswunden zu kompensieren und so den Blutdruck während der Schockphase zu stabilisieren (Rönn, T., Lendemans, S., de Groot H., Petrat F. (2010); nicht publizierte Daten). Zudem war im Rahmen einer solchen Infusion auch die konstante Applikation der Schutzstoffe möglich.

Aufgrund der Schwere des Schocks traten bereits kurz nach der therapeutischen Volumensubstitution deutliche Organschädigungen auf (siehe 3.1.3.; Abb. 13). Sowohl diese, als auch die kurze Überlebenszeit der Tiere, die ausschließlich mit RL restituiert wurden, waren sehr wahrscheinlich nicht im verringerten Hämoglobingehalt des Blutes begründet (Abb. 10A). Dieser war, insbesondere bei einem Sauerstoffangebot von 100%, immer noch hoch genug, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes zu gewährleisten (Szaflarski 1996). Vielmehr basierten die Folgen des hämorrhagischen Schocks auf dem reduzierten Blutvolumen (Hypovolämie) und der damit verbundenen Minderperfusion der Gewebe. Während und nach der Schock- und Volumensubstitutionsphase konnten anhand der schwankenden Hämoglobinkonzentration des Blutes erhebliche, reversible Flüssigkeitsverschiebungen vom Interstitium in das Gefäßsystem beobachtet werden (Abb. 10A).

Die Art der Volumensubstitutionsflüssigkeit hatte einen deutlichen Einfluss auf die Überlebenszeit der Ratten. So verlängerte sich die Überlebenszeit der Tiere, die zusätzlich Blut erhielten, im Vergleich zu Ratten, die mit reiner RL-Lösung substituiert wurden, erheblich (Abb. 18). Dieses Ergebnis wird durch andere tierexperimentelle Studien (Knotzer, Pajk et al. 2006) und klinische Erfahrungen bestätigt (Moore,

Moore et al. 2009). Somit kann das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Modell sowohl für Versuche mit festgelegtem Endpunkt (d. h. alle Tiere überleben die gesamte Versuchsdauer) als auch für Untersuchungen zum Einfluss potentieller Schutzstoffe auf die Überlebenszeit genutzt werden.

In vielen Tiermodellen zum hämorrhagischen Schock werden Heparine eingesetzt, um die Koagulation des während der Schockeinleitung entnommenen und später autotransfundenen Blutes zu verhindern (Stein, Hinder et al. 1990; Lomas-Niera, Perl et al. 2005; Legrand, Mik et al. 2010). Klinisch werden Heparine bei hämorrhagischem Schock nicht eingesetzt und sind kontraindiziert, da sie das Stillen der Blutung erschweren (Ernits, Mohan et al. 2005). Darüber hinaus sind für Heparine Schutzeffekte vor den Folgen des hämorrhagischen Schocks beschrieben worden (Wang, Singh et al. 1990; Rana, Singh et al. 1992; Call und Remick 1998), die aber für das vorliegende Modell unerwünscht waren, da sie die Beurteilung der Protektionseffekte der eingesetzten Schutzstoffe erschweren können. Aus diesen Gründen wurde im hier beschriebenen Modell ACDA eine auf Citrat basierende Lösung, die auch in humanen Blutkonserven enthalten ist, zur Vermeidung der Gerinnung des entnommenen Blutes eingesetzt. Eine protektive Wirkung durch ACDA im hämorrhagischen Schock oder in Modellen der Gewebeischämie/Reperfusion ist bisher nicht bekannt.

Koagulation und Hämolyse sind Risiken, die bei der Blutabnahme durch Katheter und während der Lagerung des abgenommenen Blutes nie vollständig ausgeschlossen werden können. Die Infusion von hämolytischem Blut kann im Tier zu einer artifiziell erhöhten LDH-Aktivität, oxidativem Stress (Das, Engelman et al. 1992) und, aufgrund des freien Hämoglobins, zu Nierenschäden führen (Qian, Nath et al. 2010), während die Infusion von Mikrokoageln eine Gerinnungsaktivierung, den Verschluss von Kapillargefäßen sowie den plötzlichen Tod der Tiere zur Folge haben kann (Roskopf, Wagner et al. 2001). Um die Wahrscheinlichkeit dieser negativen Einflüsse zu minimieren, wurde das Blut/RL-Gemisch vor der Reinfusion gefiltert und die LDH-Aktivität in der Restitutionslösung vor und nach der therapeutischen Volumensubstitution bestimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam es in keinem Fall zu einer Koagulation oder Hämolyse des entnommenen und später retransfundenen Blutes.

Durch das Mischen des abgenommenen Blutes mit RL-Lösung besteht die potentielle Gefahr, dass die Chelatisierungskapazität von ACDA für  $\text{Ca}^{2+}$  überschritten wird (aufgrund der hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der RL-Lösung), so dass es vor allem bei Raumtemperatur trotz des anwesenden ACDA's zu einer Koagulation kommen könnte (Ryden und Oberman 1975; Dickson und Gregory 1980). In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch die konstante Temperierung des entnommenen ACDA-Blutes auf 37°C und die unverzügliche Infusion des Blut/RL-Gemisches verhindert. Mikroskopisch nachweisbare Mikrokoagel wurden in dem Blut-RL-Gemisch nicht detektiert, so dass eine Koagulation des ACDA-Blutes in Anwesenheit von RL bei dem verwendeten Mischungsverhältnis von 1:2 sehr unwahrscheinlich ist. Alternativ können die RL-Lösung und das ACDA-Blut auch durch separate Katheter infundiert werden, was eine Koagulation nahezu ausschließt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das vorliegende Modell einen klinisch realistischen, schweren hämorrhagischen Schock simuliert, gleichzeitig aber auch gut reproduzierbar ist. Darüber hinaus werden artifizielle und irreführende Einflüsse wie Heparinisierung, unbemerkte Hämolyse und Koagulation minimiert. Somit können verschiedene Organschädigungsparameter und die Überlebenszeit verlässlich erfasst werden.

#### **4.2. Ringer- vs. Ringer-Laktat-Lösung zur therapeutischen Volumensubstitution im hämorrhagischen Schock**

Aus Versuchen, basierend auf dem unter 4.1. diskutierten Tiermodell zum schweren hämorrhagischen Schock, ging hervor, dass eine therapeutische Volumensubstitution mit RL-Lösung im Vergleich mit R-Lösung zu einem insgesamt schlechteren Resultat führt. So war die Überlebensdauer nach der ausschließlichen Behandlung mit den kristalloiden Lösungen (ohne Blut) in der Schock-RL-Gruppe deutlich kürzer als in der Schock-R-Gruppe (Abb. 18). Wurde zusätzlich zu den kristalloiden Lösungen Blut appliziert, überlebten zwar alle Tiere die komplette Versuchsdauer, jedoch waren die Organschädigungen in der Schock-RL-Gruppe im Vergleich zur Schock-R-Gruppe meist deutlich stärker ausgeprägt. Dies galt insbesondere für die Niere und den Dünndarm. Bezüglich des Säure-Basen-Status',

der Laktat-Konzentration und des pH-Wertes des Blutes wurden zwischen beiden Gruppen jedoch keine Unterschiede festgestellt.

Laktat wird unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Geweben, insbesondere in der Haut, der Dünndarmmukosa, dem Gehirn und der Muskulatur gebildet (Park 1980). Diese Gewebe produzieren täglich ca. 1,3 Mol Laktat, von dem ca. 60% in der Leber metabolisiert wird. Dort wird es bei ausreichender Sauerstoffversorgung entweder zu Glukose umgewandelt (Glukoneogenese) oder zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abgebaut. Bei beiden Prozessen wird pro Laktatmolekül ein  $\text{HCO}_3^-$ -Molekül gebildet, das sich dann alkalisierend auf das Säure-Basen-Gleichgewicht des Blutes auswirkt.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen war der Einfluss der R- und der RL-Lösung auf den arteriellen pH-Wert und das Säure-Basen-Verhältnis im Blut nahezu identisch und unabhängig davon, ob parallel Blut transfundiert wurde oder nicht. Es gab somit keine Anzeichen für eine durch das verabreichte Laktat verursachte Alkalisierung des Blutes. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Schwere des Schocks zurückzuführen. Sind die Organe, insbesondere die Leber, zu stark geschädigt und/oder steht ihnen nicht genug Sauerstoff zur Verfügung, sollte die Metabolisierung von Laktat vermindert oder unterbunden sein (Peitzman, Harbrecht et al. 1995). Diese Annahme könnte erklären, warum Matsuda et al., basierend auf einem deutlich weniger intensiven Modell des hämorrhagischen Schocks an Hunden (40 mmHg für 30 Minuten), einen signifikanten pH-Anstieg nach der therapeutischen Volumensubstitution mit RL-Lösung festgestellt haben (Matsuda, Sakurai et al. 1994).

Die ausbleibende Alkalisierung des Blutes durch exogenes Laktat kann die deutlich schlechteren, mit RL-Lösung erzielten Ergebnisse im Vergleich zu R-Lösung nicht erklären. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die laktatabhängige Hemmung der Glykolyse. Hierbei hemmen hohe Laktatkonzentrationen direkt die Glykolyse (direkte Hemmung der Phosphofruktokinase durch Laktat) oder bewirken eine indirekte Hemmung durch die Erzeugung von  $\text{H}^+$  aus der Hydrolyse von ATP (niedriger pH-Wert -> Hemmung der Phosphofruktokinase) (Robergs, Ghiasvand et al. 2004; Leite, Coelho et al. 2011). Die Hemmung der Glykolyse könnte auch für den nicht erhöhten Plasmalaktatgehalt in der Schock-RL + Blut-Gruppe im Vergleich zur Schock-R + Blut-Gruppe verantwortlich sein. Bei gleicher Laktatbildung durch die anaerobe

Glykolyse wäre ansonsten ein deutlicher Anstieg der Laktatkonzentration im Blut der Schock-RL + Blut-Tiere zu erwarten gewesen. Einen signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration konnte jedoch nur in der Schock-RL-Gruppe beobachtet werden. Dieser Anstieg ist vermutlich eine Folge der starken Schädigungen der Laktat metabolisierenden Gewebe in dieser Gruppe, weshalb ein Laktatabbau nicht mehr möglich ist. Da die Laktatkonzentration in den Gruppen, die zusätzlich Blut zur Volumensubstitution erhielten, nicht anstieg, ist davon auszugehen, dass die Laktat metabolisierenden Gewebe in diesen Gruppen deutlich weniger geschädigt wurden als in der Schock-RL-Gruppe.

Anders als zum direkten Vergleich mit R-Lösung sind bereits einige Untersuchungen publiziert worden, in denen die Effekte einer Volumensubstitution mit RL-Lösung mit denen durch isotonische Kochsalzlösung verglichen wurden. Die meisten der dafür verwendeten Tiermodelle basieren auf deutlich leichteren Varianten des hämorrhagischen Schocks (Halvorsen, Gunther et al. 1991; Greiffenstein, Mathis et al. 2007; Molina, Whitaker et al. 2009). Dies könnte auch das im Vergleich zu R-Lösung bessere „outcome“ durch RL-Lösung unter den von Matsuda et al. (Matsuda, Sakurai et al. 1994) beschriebenen Bedingungen erklären. Allerdings könnten die, verglichen mit isotonischer Kochsalzlösung, günstigeren Effekte durch RL-Lösung in den verschiedenen Modellen auch nicht auf dem Laktat selbst, sondern auf der in der RL-Lösung enthaltenen physiologischen Konzentration von Chlorid beruhen (Traverso, Lee et al. 1986; Todd, Malinoski et al. 2007).

Unabhängig von den unterschiedlichen Effekten durch reine RL-Lösung und R-Lösung führte die zusätzliche Gabe von Blut in dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell jeweils zu einer deutlich verlängerten Überlebenszeit. Dies wurde wahrscheinlich durch eine verbesserte mikrovaskuläre Perfusion, der damit einhergehenden gesteigerten Sauerstoffversorgung der Organe sowie durch eine verminderte Azidose verursacht (Dronen, Stern et al. 1992; Zakaria, Spain et al. 2002; Knotzer, Pajk et al. 2006).

Die stärkste Organschädigung in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen trat in der Niere auf. Die Niere ist auch entsprechend der Literatur eines der am schnellsten und intensivsten beim hämorrhagischen Schock geschädigten Organe (Gong, Wang et al. 2003; Efrati, Berman et al. 2008). Eine durch hämorrhagischen Schock verursachte Ischämie der Niere führt häufig zu

akutem Nierenversagen. Das akute Nierenversagen ist gekennzeichnet durch eine massiv reduzierte glomeruläre Filtrationsrate, eine beeinträchtigte Natrium- und Wasserresorption infolge einer Läsion der Nierentubuli.

Zusammenfassend ergibt sich eine insgesamt geringere Organ- und Gewebeschädigung der Tiere, die R-Lösung statt RL-Lösung zur Volumensubstitution erhielten. Dieser positive Effekt zeigte sich sowohl bei der Verwendung der rein kristalloiden Lösungen, als auch in Kombination mit der Retransfusion von Blut. Allerdings gilt dies sehr wahrscheinlich nur für den schweren hämorrhagischen Schock. Für leichtere Schockvarianten sollte aufgrund der oben diskutierten Erwägungen RL-Lösung zur Volumensubstitution durchaus geeignet sein. Zur Klärung dieser Problematik sind weiterführende Versuche in verschiedenen Modellen des hämorrhagischen Schocks zwingend erforderlich.

### **4.3. Protektion durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Deferoxamin/ LK 614**

#### **4.3.1. Glycin**

Glycin (15 mg/kgxh), die am einfachsten aufgebaute Aminosäure, zeigte in verschiedenen Parametern deutliche Schutzeffekte vor der Organ- und Gewebeschädigung durch schweren hämorrhagischen Schock. Es verbesserte den Säure-Basen-Status (Abb. 21B) und hatte eine protektive Wirkung auf die Muskulatur (CK; nicht gezeigt), den Darm (Hämoglobingehalt, Makroscore; Abb. 23A,C) und die Niere (Hämoglobingehalt, Histologie; Abb 23 B und Tab. 2). Die Mechanismen der Protektion durch Glycin vor den Folgen einer beim hämorrhagischen Schock auftretenden Ischämie und Reperfusion sind in vivo weitgehend unklar, vermutlich aber antiinflammatorischer und direkt cytoprotektiver Natur (Petrat, Boengler et al. 2011).

Wie zuvor unter 1.5.1. dargestellt, wurde Glycin bereits in mehreren Rattenmodellen des hämorrhagischen Schocks eingesetzt (Zhong, Enomoto et al. 1999; Mauriz, Matilla et al. 2001; Wang, Zhao et al. 2004). Zhong et al. setzten dabei Dosen von

11-90 mg/kg Glycin ein, das intravenös als Bolus verabreicht wurde (Zhong, Enomoto et al. 1999). Die Schockdauer betrug 60 Minuten bei 30-35 mmHg und die therapeutische Volumensubstitution erfolgte mit RL-Lösung. In diesem Modell sorgte Glycin für eine Verminderung des Anstiegs des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  sowie eine verringerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. In einem ähnlichen Modell, in dem jedoch auch Blut zur Volumensubstitution eingesetzt wurde, konnten Wang et al. zeigen, dass die durch Glycin (20-100 mg/kg) verminderte Produktion von TNF- $\alpha$  auf der Blockade von Kalziumkanälen in der Plasmamembran beruht (Wang, Zhao et al. 2004; siehe unten). Mauriz et al. konnten darüber hinaus in einem Modell des hämorrhagischen Schocks, in dem Glycin (durchschnittlich 0,97 g/Tier) mit der Nahrung verabreicht wurde, zeigen, dass die Leber durch Glycin signifikant geschützt wird (Histologie, Transaminasen; Mauriz, Matilla et al. 2001).

Ein wichtiger Protektionsmechanismus durch Glycin vor der Organschädigung durch hämorrhagischen Schock könnte die für verschiedene Zelltypen des Immunsystems (z.B. Neutrophile und Makrophagen) nachgewiesene rezeptorvermittelte Aktivierung von Anionenkanälen in der Zellmembran sein, wodurch vermehrt Chlorid-Ionen in die Zellen eindringen (Froh, Thurman et al. 2002). Infolge dessen kommt es zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran, was die Öffnung von Kalziumkanälen in der Plasmamembran erschwert, einen Kalziumeinstrom in die Zellen verhindert und so die Aktivierung der Immunzellen unterdrückt (Wheeler, Stachlewitz et al. 2000; Li, Bradford et al. 2001). Dadurch wird die Ausschüttung von inflammatorischen Cytokinen vermindert, was wiederum in einer geringeren Zellschädigung der Organe resultiert.

Über seine antiinflammatorischen Eigenschaften hinaus sind für Glycin auch direkte cytoprotektive Effekte beschrieben worden. So vermindert es proteolytische Vorgänge in hypoxischen Zellen. Hierbei soll die Hemmung der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, nicht-lysosomale Proteasen katalysierten Proteolyse eine besonders große Rolle spielen. Dieser protektive Effekt des Glycin wurde bisher für isolierte Hepatozyten (Nichols, Bronk et al. 1994) und proximale Tubuluszellen der Niere (Tijssen, Peters et al. 1997) gezeigt. Ein weiterer möglicher Schutzmechanismus ist die Verringerung der unspezifischen Permeabilitäterhöhung der Zellmembran durch Hypoxie und des daraus resultierenden Einstroms von Natrium (Frank, Rauen et al. 2000). Von diesen Autoren wird hierbei der glycinabhängige Verschluss

unspezifischer Lecks in der Plasmamembran angenommen, während in anderen Publikationen die Existenz einer spezifischen pathologischen Pore postuliert wird, deren Öffnung durch Glycin verhindert wird (Nishimura und Lemasters 2001). Die Existenz dieser Pore konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden.

Ob die beschriebenen Mechanismen an den im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten Schutzeffekten beteiligt sind, ist unklar. Möglich ist eine Kombinationswirkung der verschiedenen Mechanismen, die sich dann zum sichtbaren Gesamtschutzeffekt addieren. Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich kaum Rückschlüsse auf die der Protektion durch Glycin zugrunde liegenden Mechanismen ziehen. Jedoch war dies auch nicht das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit (siehe 1.7.)

#### **4.3.2. Pyruvat**

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Pyruvat (50 mg/kgxh) erzielten Schutzeffekte basieren sehr wahrscheinlich auf mehreren Mechanismen. Die für die erzielten Effekte vermutlich wichtigsten Mechanismen werden im Folgenden diskutiert.

Die aus dem hämorrhagischen Schock und der Volumensubstitution resultierende metabolische Azidose wurde durch Pyruvat signifikant vermindert (pH-Wert, SBS; Abb. 21). Dieser Effekt beruht vermutlich auf der intrazellulären Metabolisierung von Pyruvat zu Bikarbonat, welches dann im Blut seine Eigenschaften als Puffer des pH-Wertes entfaltet (Karetzky und Cain 1969). Zudem wurde die Plasmaaktivität der CK, ein Markerenzym der Muskulatur (Abb. 22A), und die Einblutung ins Nierengewebe (Hämoglobingehalt; Abb. 23B) durch Pyruvat signifikant reduziert.

Basierend auf publizierten Angaben zur Gewebeprotektion vor verschiedenen Schädigungsstimuli soll Pyruvat direkte antioxidative Eigenschaften besitzen (Mallet, Sun et al. 2005). Demnach reagiert Pyruvat mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), wodurch, unter Abspaltung von Acetat,  $CO_2$  und  $H_2O$  entstehen. Hierdurch soll die eisenabhängige Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion (siehe 4.3.4.) verhindert werden. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Pyruvat das ebenfalls hochreaktive und zellschädigende Peroxynitrit zu Nitrit ( $NO_2$ )



und  $\text{CO}_2$  neutralisiert (Mallet, Sun et al. 2005). Ein indirekter antioxidativer Mechanismus des Pyruvats, der ebenfalls eine Rolle spielen könnte, ist die Hemmung der Produktion von Superoxidradikalen durch die NADH-Oxidase. In Versuchen an Meerschweinchenherzen wurde gezeigt, dass Pyruvat (5-10 mM im Herzperfusat) der Oxidase das Substrat (NADH) entzieht, indem es das Gleichgewicht der LDH-Reaktion in Richtung der NADH-Oxidation verschiebt (Bassenge, Sommer et al. 2000). Die hier vorgestellten Mechanismen der antioxidativen Wirkung des Pyruvats sollen sich Zellen auch zunutze machen, indem sie bei oxidativem Stress Pyruvat abgeben (O'Donnell-Tormey, Nathan et al. 1987). Dies wurde als Bestätigung der Hypothese angesehen, dass Pyruvat ein äußerst effektives Antioxidans ist. Ein weiterer sich protektiv auswirkender Umstand ist die Funktion des Pyruvats als Substrat der Mitochondrien, die aus Pyruvat über den Citratzyklus NADH,  $\text{FADH}_2$  und ATP bereitstellen, sodass die Energiesituation der Zelle, insbesondere während und nach der therapeutischen Volumensubstitution, durch Pyruvat verbessert werden könnte (Mallet, Sun et al. 2005). Auch in Tiermodellen des hämorrhagischen Schocks wurde Pyruvat bereits eingesetzt. So konnten Mongan et al. an einem Schweinemodell mit einer Schocktiefe von 40 mmHg für 30 Minuten durch Pyruvat (500 mg/kgxh) umfangreiche Schutzeffekte auf die Leber (Verminderung der Apoptose) (Mongan, Capacchione et al. 2002) und das Gehirn (Verbesserung des Gehirn-Cortex-Metabolismus) (Mongan, Capacchione et al. 2001) sowie eine deutlich verlängerte Überlebenszeit erzielen (Mongan, Fontana et al. 1999). Darüber hinaus konnten von Koustova et al. in einem Rattenmodell mit einer Schockdauer von 75 Minuten nach einer Blutabnahme von 27 ml/kg eine deutliche Verminderung der Apoptose in der Lunge durch Pyruvat festgestellt werden (Koustova, Rhee et al. 2003). In diesem Modell wurde Pyruvat an Stelle von Laktat der Volumensubstitutionslösung zugesetzt. Welche der oben beschriebenen Protektionsmechanismen in den erwähnten Tiermodellen maßgeblich sind, bleibt allerdings weitgehend unbekannt.

Ähnlich wie für Glycin, werden also auch für Pyruvat zahlreiche Schutzmechanismen postuliert. Die gewebeprotektiven Effekte des Pyruvats scheinen eine Kombination aus verschiedenen Mechanismen zu sein, die zusammen das im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Gesamtprotektionspotential des Pyruvates ausmachen. Hierbei ist der antiazidotische Effekt des Pyruvats am besten durch die Versuchsergebnisse (pH-Wert, SBS) zu belegen. Die anderen beschriebenen

Schutzmechanismen konnten mit den für diese Arbeit gewählten Parametern nicht sicher nachgewiesen werden und sind daher hypothetisch.

#### 4.3.3. Resveratrol

Die Infusion von Resveratrol (60 µg/kgxh) bewirkte in verschiedenen Organen eine Protektion vor den Folgen des hämorrhagischen Schocks. So wurden die Leber (ASAT; nicht gezeigt), die Muskulatur (CK; Abb 22A), der Dünndarm (Makroscore; Abb. 23C) und die Nieren (Hämoglobingehalt, Erythrozyten in der Nierenrinde, Einblutung in die Glomeruli Abb. 23B/Tab. 2) signifikant geschützt.

Die in der Literatur beschriebenen Mechanismen, die der Protektion durch Resveratrol vor Zell- und Gewebeschädigungen zu Grunde liegen sollen, sind sehr vielfältig (Shakibaei, Harikumar et al. 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sehr viel geringere Dosen von Resveratrol eingesetzt als in anderen Tiermodellen des hämorrhagischen Schocks (8-30 mg/kg), was den Vergleich des protektiven Potentials und möglicher zugrunde liegender Mechanismen erschwert. Aufgrund der großen Dosierungsunterschiede ist es wahrscheinlich, dass die in der Literatur für Resveratrol im hämorrhagischen Schock beschriebenen Schutzmechanismen stark von denen des vorliegenden Modells abweichen. So ist in der vorliegenden Arbeit eine direkte antioxidative Wirkung, d. h. ein Abfangen und Neutralisieren reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch Resveratrol, sehr unwahrscheinlich. Dies wurde auch bereits hinsichtlich seiner Protektion vor der Schädigung des Dünndarms durch Ischämie und Reperfusion diskutiert (Petrat und De Groot 2011). Wahrscheinlicher ist, dass Resveratrol die Aktivität antioxidativ wirkender Enzyme stimuliert (Jang, Kang et al. 1999). Hierbei handelt es sich um die Enzyme Katalase und Superoxid-Dismutase (Gedik, Girgin et al. 2008). Die Katalase ist eine Oxidoreduktase, die  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  abbaut und somit die potentielle Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale im Rahmen der Fenton-Reaktion (siehe 4.3.4.) verhindert. So kann sie den oxidativen Stress durch warme Ischämie/Reperfusion der Leber bei Ratten deutlich reduzieren, indem sie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies vermindert (Shen, Zhang et al. 2007). Die Superoxid-Dismutase katalysiert die Disproportionierung des Superoxid-Anions zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das dann wiederum von der Katalase zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  umgewandelt wird. Durch

die Förderung dieser Mechanismen kann Resveratrol die körpereigene Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies stärken und oxidativen Stress minimieren. Es ist jedoch unklar, wie genau Resveratrol die Enzyme aktiviert und ob die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Resveratrol-dosis ausreicht, um eine Enzymaktivierung zu bewirken. Auch die Messwerte der in dieser Versuchsserie bestimmten Parameter geben zu diesen Fragen keine Lösungshinweise.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, über den Resveratrol beim hämorrhagischen Schock protektiv wirken könnte, scheint auf den antiinflammatorischen Eigenschaften des Polyphenols zu beruhen. In einem zellbiologischen in vitro Modell verschiedener humaner Gewebe wurde gezeigt, dass Resveratrol die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 unterdrücken kann (Manna, Mukhopadhyay et al. 2000). Da beide Transkriptionsfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Produktion proinflammatorischer Cytokine haben, soll Resveratrol auf diesem Weg eine Inflammation entscheidend vermindern (De La Lastra und Villegas 2005). Da sich die zellbiologischen Ergebnisse von Manna et al. nicht vollständig auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete Rattenmodell übertragen lassen, ist eine abschließende Aussage über den Beitrag dieses Schutzmechanismus zum Gesamtschutzeffekt in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Aufgrund der deutlich höheren eingesetzten Resveratrol-Dosen in anderen Tiermodellen z.B. (Yu, Hsu et al. 2008; Tsai, Liu et al. 2011) und der geringen Wasserlöslichkeit des Polyphenols (12  $\mu$ g/ml) musste Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel eingesetzt werden, welches jedoch unerwünschte Nebenwirkungen hat (Brayton 1986) und die Effekte des Resveratrols verfälschen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde daher bewusst auf den Einsatz von organischen Lösungsmitteln verzichtet. In weiterführenden Versuchen könnte die Messung verschiedener proinflammatorischer Cytokine genauere Aufschlüsse über den Schutzeffekt von Resveratrol bezüglich der Inflammation geben.

Über diese als am wichtigsten angesehenen Protektionsmechanismen vor den Folgen des hämorrhagischen Schocks hinaus, gibt es noch eine große Anzahl anderer potentieller Schutzmechanismen von Resveratrol, z.B. seine inhibierende Wirkung auf die Lipidperoxidation (Pinto, García-Barrado et al. 1999) oder antiapoptotische Effekte (Xia, Ding et al. 2011), die für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Schutzeffekte mitverantwortlich sein könnten. Resveratrol ist speziell für den Einsatz im hämorrhagischen Schock interessant, weil viele seiner potentiellen

Schutzmechanismen an den pathogenetischen Folgen des hämorrhagischen Schocks anzusetzen scheinen.

#### 4.3.4. Eisenchelatoren

Die Kombination des hydrophilen, hauptsächlich extrazellulär wirkenden Eisenchelators Deferoxamin und des membrangängigen, intrazellulär wirkenden Eisenchelators LK 614 führte zu einem deutlichen Schutz verschiedener Organe vor den Folgen des hämorrhagischen Schocks. Hierbei sind besonders die protektiven Effekte auf den Darm (Hämoglobingehalt, Makroscore, Darmgewicht; Abb. 23A,C), die Nieren (Hämoglobingehalt, Blutgehalt der Nierenrinde; Abb. 23B/Tab. 2), die Leber (ALAT; nicht gezeigt) sowie die Muskulatur (CK; Abb. 22A) hervorzuheben. Die in der vorliegenden Arbeit belegte Leber-Protektion durch Deferoxamin im hämorrhagischen Schock wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Rose, Pizanis et al. 2000; Rana, Shapiro et al. 2002)(siehe auch 1.5.4.1.). LK 614 wurde bisher noch nicht im hämorrhagischen Schock eingesetzt, zeigte aber bereits an isolierten Organen seine Wirksamkeit (Wu, Wohlschlaeger et al. 2009; Koch, Loganathan et al. 2010) (siehe auch 1.5.4.2.).

Entsprechend der Literatur basieren protektive Effekte von Eisenchelatoren vor allem auf ihren antioxidativen Eigenschaften (Jomova und Valko 2011). So wird durch die Chelatisierung redoxaktiver Eisenionen durch Deferoxamin und LK 614 die eisenvermittelte Haber-Weiss-Reaktion unterbunden. Bei dieser werden zunächst  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen durch Superoxid-Anionen zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen reduziert. Diese reagieren anschließend in der sogenannten Fenton-Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wobei neben  $\text{Fe}^{3+}$  und einem  $\text{OH}^-$ -Ion auch das hochreaktive Hydroxylradikal entsteht, das sowohl zell- als auch erbgutschädigend wirken kann. Durch die Chelatisierung der Eisenionen durch Deferoxamin und LK 614 wird diese Reaktion durch die Bildung redoxinaktiver Chelatkomplexe unterbunden und so eine Schädigung durch Hydroxylradikale vermieden (Morita, Ihnken et al. 1995). Die Kombination von intrazellulärer und extrazellulärer Eisenchelatisierung in der vorliegenden Arbeit konnte die Bildung von Hydroxylradikalen offenbar gut verhindern, obgleich weder Komplexbildung noch die Bildung von Radikalen gemessen wurde. Damit zeichnete sich die Kombination von

Deferoxamin und LK 614 als äußerst potenter Ansatz zur Behandlung der Folgen des hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution aus.

Zusammenfassend konnte belegt werden, dass alle eingesetzten Schutzstoffe protektive Effekte vor den Folgen des schweren hämorrhagischen Schocks und der therapeutischen Volumensubstitution bewirkten. Die Schutzstoffe führten in den verschiedenen Organen zu einer unterschiedlich starken Protektion, wobei kein Schutzstoff aufgrund einer gänzlich fehlenden Wirkung ausgeschlossen wurde. Deshalb sollten alle Schutzstoffe hinsichtlich der Zusammenstellung von Kombinationslösungen berücksichtigt werden. Dies war jedoch aus zeitlichen Gründen nicht möglich, weshalb nur einige Schutzstoffkombinationen (siehe 2.2.5.4.) getestet werden konnten.

#### **4.4. Synergistische Effekte durch die Schutzstoffkombinationen**

In den Versuchsgruppen Eisenchelatoren + Glycin sowie Glycin + Pyruvat konnten in mehreren Parametern tendenziell verbesserte Schutzeffekte im Vergleich zu den Einzelsubstanzen erzielt werden (siehe 3.4.). Jedoch blieben die synergistischen Effekte der Kombinationslösungen insgesamt gering. In der Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe traten durch die Kombinationslösung sogar eher schädigende Effekte auf.

Da diese Stoffkombinationen vorher noch nie in vergleichbaren Modellen eingesetzt wurden, ist eine Interpretation der zugrundeliegenden Mechanismen schwierig und war auch nicht Ziel dieser Arbeit. Die synergistische Schutzwirkung von Glycin + Pyruvat deutet deren protektives Potenzial an, das jedoch noch weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen bedarf. Für die im Vergleich zu den Einzelsubstanzen eher schlechteren Ergebnisse in der Eisenchelatoren + Resveratrol-Gruppe gibt es bisher keine schlüssige Erklärung. Möglicherweise kommt es aufgrund ähnlicher bzw. überlappender Protektionsmechanismen zu Nebenwirkungen, die bei den einzeln applizierten Schutzstoffen nicht auftreten oder von den jeweiligen Schutzeffekten überlagert werden.

Die insgesamt betrachtet geringen synergistischen Effekte der Kombinationslösungen können mit der sehr guten Schutzwirkung der einzelnen

Schutzstoffe erklärt werden, die sich durch die Kombinationslösungen kaum noch verbessern ließ.

## 5. Zusammenfassung

Die Zusammensetzung der initial für die therapeutische Volumensubstitution im hämorrhagischen Schock einzusetzenden Infusionslösung ist seit Jahrzehnten ein kontrovers diskutiertes Thema in der Notfallmedizin. Bisher existiert keine, in Notfallsituationen direkt verfügbare Infusionslösung, die sowohl eine nachhaltige Volumensubstitution, eine verbesserte O<sub>2</sub>-Versorgung als auch eine Verminderung der schockbedingten Organschädigung gewährleisten kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst ein Rattenmodell etabliert, um einen möglichst schweren hämorrhagischen Schock und die sich anschließende Volumensubstitutionsphase möglichst reproduzierbar, effektiv und klinisch realistisch simulieren zu können. Hierzu wurde eine Schockdauer von 45 bzw. 60 Minuten bei einem mittleren arteriellen Blutdruck von 25-30 mmHg, eine Volumensubstitutionszeit von 30 Minuten und eine anschließende Beobachtungszeit von 150 Minuten gewählt. Dieses Modell erwies sich als gut reproduzierbar, lebensbedrohlich schwer und klinisch realistisch.

Unter Verwendung dieses Modells wurde anschließend die therapeutische Qualität von Ringer- und Ringer-Laktat-Lösung als Volumensubstitutionslösung, jeweils mit und ohne Zugabe paralleler Transfusion des Eigenblutes, verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Ringer-Lösung im Vergleich zu Ringer-Laktat-Lösung eine bessere Organprotektion und eine verlängerte Überlebensdauer der Ratten gewährleistete. Insbesondere die Niere und der Dünndarm wurden bei der Volumensubstitution mit Ringer-Lösung vergleichsweise weniger geschädigt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde anschließend in Versuchen mit Ringer-Lösung und Blut zur Volumensubstitution der therapeutische Effekt der Schutzstoffe Glycin (15 mg/kgxh), Pyruvat (50 mg/kgxh), Resveratrol (60 µg/kgxh) und Deferoxamin + LK 614 (2,5 mg/kgxh Desferal + 0,5 mg/kgxh LK 614), auf die Restitutionsphase und die anschließende Beobachtungsphase untersucht. Wie zu erwarten war, konnten nicht anhand aller Schädigungsparameter Schutzeffekte nachgewiesen werden. So wurde durch alle Schutzstoffe der Hämoglobingehalt im Nierengewebe und die Aktivität der Kreatinkinase im Plasma signifikant vermindert. Bezüglich der Protektion des Dünndarms zeigten vor allem Glycin und Deferoxamin + LK 614 deutliche Schutzeffekte, während die Azidose während und nach der

therapeutischen Volumensubstitution durch Pyruvat signifikant vermindert wurde. Hinsichtlich der histologischen Organbefundung zeigten Glycin, Pyruvat und Resveratrol sehr gute Effekte auf das Nierengewebe und Glycin und Pyruvat ebenso auf das Lebergewebe. Aufgrund dieser erfolgversprechenden Ergebnisse wurden alle eingesetzten Schutzstoffe für die anschließenden Versuche mit Kombinationslösungen berücksichtigt. In dieser abschließenden Versuchsserie wurde untersucht, ob die Kombination von Deferoxamin/LK 614 + Glycin, Deferoxamin/LK 614 + Pyruvat, Deferoxamin/LK 614 + Resveratrol und Glycin + Pyruvat zu synergistischen Schutzeffekten führt. Hierbei zeigten sich durch den Einsatz der Kombinationslösungen kaum synergistische Effekte.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ist ein Grundstein gelegt, um in absehbarer Zeit die Erstversorgung von Patienten mit hämorrhagischem Schock zu optimieren. Beruhend auf diesen Ergebnissen ist jedoch weitere Forschungsarbeit nötig, um eine klinisch einsetzbare Protektionslösung zu entwickeln. Dabei müssen allerdings stets mögliche Nebenwirkungen und die Einsetzbarkeit der Lösung in Notfallsituationen im Auge behalten werden.



## 6. Literaturverzeichnis

Alkan, A., Eroglu, F., et al. (2006). "Protective effects of N-acetylcysteine and erdosteine on hemorrhagic shock-induced acute lung injury." *European Journal of Emergency Medicine* **13**(5): 281-285.

Angele, M. K., Schneider, C. P., et al. (2008). "Bench-to-bedside review: Latest results in hemorrhagic shock." *Critical Care* **12**(4).

Bahrami, S., Benisch, C., et al. (2011). "Xylazine-/diazepam-ketamine and isoflurane differentially affect hemodynamics and organ injury under hemorrhagic/traumatic shock and resuscitation in rats." *Shock* **35**(6): 573-578.

Bassenge, E., Sommer, O., et al. (2000). "Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **279**(5 48-5): H2431-H2438.

Brayton, C. F. (1986). "Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review." *The Cornell veterinarian* **76**(1): 61-90.

Call, D. R. und Remick, D. G. (1998). "Low molecular weight heparin is associated with greater cytokine production in a stimulated whole blood model." *Shock* **10**(3): 192-197.

Chang, T. M. S. und Varma, R. (1992). "Effect of a single replacement of one of Ringer lactate, hypertonic saline/dextran, 7g% albumin, stroma-free hemoglobin, o-raffinose polyhemoglobin or whole blood on the long term survival of unanesthetized rats with lethal hemorrhagic shock after 67% acute blood loss." *Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnology* **20**(2-4): 503-510.

Chiu, C. J., McArdle, A. H., et al. (1970). "Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal." *Archives of Surgery* **101**(4): 478-483.

Das, D. K., Engelman, R. M., et al. (1992). "Oxygen-derived free radicals and hemolysis during open heart surgery." *Molecular and cellular biochemistry* **111**(1-2): 77-86.

Das, S. und Das, D. K. (2007). "Resveratrol: A therapeutic promise for cardiovascular diseases." *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* **2**(2): 133-138.

De Groot, H. (2005). "Injury to visceral organs by ischemia and reperfusion. Processes in pathogenetic networks." *Zentralblatt für Chirurgie* **130**: 202-212.

De La Lastra, C. A. und Villegas, I. (2005). "Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications." *Molecular Nutrition and Food Research* **49**(5): 405-430.

Della-Morte, D., Dave, K. R., et al. (2009). "Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway." *Neuroscience* **159**(3): 993-1002.

Dickson, D. N. und Gregory, M. A. (1980). "Compatibility of blood with solutions containing calcium." *South African Medical Journal* **57**(19): 785-787.

Dronen, S. C., Stern, S., et al. (1992). "Improved outcome with early blood administration in a near-fatal model of porcine hemorrhagic shock." *American Journal of Emergency Medicine* **10**(6): 533-537.

Efrati, S., Berman, S., et al. (2008). "Application of normobaric hyperoxia therapy for amelioration of haemorrhagic shock-induced acute renal failure." *Nephrology Dialysis Transplantation* **23**(7): 2213-2222.

Ernits, M., Mohan, P. S., et al. (2005). "A retroperitoneal bleed induced by enoxaparin therapy." *American Surgeon* **71**(5): 430-433.

Eser, O., Kalkan, E., et al. (2007). "The effect of aprotinin on brain ischemic-reperfusion injury after hemorrhagic shock in rats: An experimental study." *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care* **63**(2): 373-378.

Fink, M. P. (2002). "Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **5**(2): 167-174.

Fox, J. E. und Daniel, E. E. (1987). "Exogenous opiates: their local mechanisms of action in the canine small intestine and stomach." *The American journal of physiology* **253**(2): 179-188.

Frank, A., Rauen, U., et al. (2000). "Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: Inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks." *Journal of Hepatology* **32**(1): 58-66.

Frémont, L. (2000). "Biological effects of resveratrol." *Life sciences* **66**(8): 663-673.

Froh, M., Thurman, R. G., et al. (2002). "Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **283**(4 46-4): G856-G863.

Fulda, S. (2010). "Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer." *Drug Discovery Today* **15**(17-18): 757-765.

Gainer, J. L., Lipa, M. J., et al. (1995). "Hemorrhagic shock in rats." *Laboratory Animal Science* **45**(2): 169-172.

Gedik, E., Girgin, S., et al. (2008). "Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats." *World Journal of Gastroenterology* **14**(46): 7101-7106.

Gong, H., Wang, W., et al. (2003). "Reduced renal expression of AQP2, p-AQP2 and AQP3 in haemorrhagic shock-induced acute renal failure." *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**(12): 2551-2559.

Greiffenstein, P., Mathis, K. W., et al. (2007). "Alcohol binge before trauma/hemorrhage impairs integrity of host defense mechanisms during recovery." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **31**(4): 704-715.

Gundersen, R. Y., Vaagenes, P., et al. (2005). "Glycine - An important neurotransmitter and cytoprotective agent." *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **49**(8): 1108-1116.

Halvorsen, L., Gunther, R. A., et al. (1991). "Dose response characteristics of hypertonic saline dextran solutions." *Journal of Trauma* **31**(6): 785-794.

Hassan-Khabbar, S., Cottart, C. H., et al. (2008). "Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: A possible strategy in liver surgery." *Liver Transplantation* **14**(4): 451-459.

Herold, G. (2007). *Innere Medizin*.

Hierholzer, C. und Billiar, T. R. (2001). "Molecular mechanisms in the early phase of hemorrhagic shock." *Langenbeck's Archives of Surgery* **386**(4): 302-308.

Hoppen, R. A., Corso, C. O., et al. (2005). "Hypertonic saline and hemorrhagic shock: hepatocellular function and integrity after six hours of treatment." *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. **20**(6): 414-417.

Hußmann, B., Taeger, G., et al. (2011). "Lethality and outcome in multiple injured patients after severe abdominal and pelvic trauma : Influence of preclinical volume replacement - An analysis of 604 patients from the trauma registry of the DGU." Letalität und Outcome beim Mehrfachverletzten nach schwerem Abdominal- und Beckentrauma : Einfluss der präklinischen Volumengabe - Eine Auswertung von 604 Patienten des TraumaRegisters der DGU **114**(8): 705-712.

Jacob, T., Ascher, E., et al. (2003). "Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat model." Surgery **134**(3): 457-466.

Jang, D. S., Kang, B. S., et al. (1999). "Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production." Biochemical Pharmacology **57**(6): 705-712.

Jomova, K. und Valko, M. (2011). "Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease." Current pharmaceutical design **17**(31): 3460-3473.

Kallakuri, S., Ascher, E., et al. (2003). "Protective effect of glycine in mesenteric ischemia and reperfusion injury in a rat model." Journal of Vascular Surgery **38**(5): 1113-1120.

Karetzky, M. S. und Cain, S. M. (1969). "Effect of sodium pyruvate infusion on acid-base balance and gas exchange in the dog." The American journal of physiology **217**(5): 1472-1476.

Karuppagounder, S. S., Pinto, J. T., et al. (2009). "Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease." Neurochemistry International **54**(2): 111-118.

Kaur, P., Basu, S., et al. (2011). "Transfusion protocol in trauma." Journal of Emergencies, Trauma and Shock **4**(1): 103-108.

Kauvar, D. S., Lefering, R., et al. (2006). "Impact of hemorrhage on trauma outcome: An overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations." Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care **60**(6 SUPPL.): S3-S9.

Kehrer, J. P. (2000). "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity." Toxicology **149**(1): 43-50.

Knotzer, H., Pajk, W., et al. (2006). "Comparison of lactated Ringer's, gelatine and blood resuscitation on intestinal oxygen supply and mucosal tissue oxygen tension in haemorrhagic shock." British Journal of Anaesthesia **97**(4): 509-516.

Koch, A., Loganathan, S., et al. (2010). "Deferoxamine, the newly developed iron chelator LK-614 and N- $\alpha$ -acetyl-histidine in myocardial protection." *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* **10**(2): 181-184.

Koustova, E., Rhee, P., et al. (2003). "Ketone and pyruvate Ringer's solutions decrease pulmonary apoptosis in a rat model of severe hemorrhagic shock and resuscitation." *Surgery* **134**(2): 267-274.

Legrand, M., Mik, E. G., et al. (2010). "Fluid resuscitation does not improve renal oxygenation during hemorrhagic shock in rats." *Anesthesiology* **112**(1): 119-127.

Leite, T. C., Coelho, R. G., et al. (2011). "Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice." *FEBS Letters* **585**(1): 92-98.

Lelli Jr, J. L., Pradhan, S., et al. (1993). "Prevention of Postischemic Injury in Immature Intestine by Deferoxamine." *Journal of Surgical Research* **54**(1): 34-38.

Li, X., Bradford, B. U., et al. (2001). "Dietary glycine prevents peptidoglycan polysaccharide-induced reactive arthritis in the rat: Role for glycine-gated chloride channel." *Infection and Immunity* **69**(9): 5883-5891.

Lomas-Niera, J. L., Perl, M., et al. (2005). "Shock and hemorrhage: An overview of animal models." *Shock* **24**(SUPPL. 1): 33-39.

Majde, J. A. (2003). "Animal models for hemorrhage and resuscitation research." *The Journal of trauma* **54**(5 Suppl): S100-105.

Mallet, R. T., Sun, J., et al. (2005). "Metabolic cardioprotection by pyruvate: Recent progress." *Experimental Biology and Medicine* **230**(7): 435-443.

Manna, S. K., Mukhopadhyay, A., et al. (2000). "Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- $\kappa$ B, activator protein-1, and apoptosis: Potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation." *Journal of Immunology* **164**(12): 6509-6519.

Matsuda, Y., Sakurai, T., et al. (1994). "Comparative study on the effects of acetated Ringer's solution, lactated Ringer's solution, Ringer's solution, and 5% glucose-acetate Ringer's solution on canine hemorrhagic shock." *Journal of Anesthesia* **8**(3): 326-333.

Mauriz, J. L., Matilla, B., et al. (2001). "Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat." *Free Radical Biology and Medicine* **31**(10): 1236-1244.

Molina, M. F., Whitaker, A., et al. (2009). "Alcohol does not modulate the augmented acetylcholine-induced vasodilatory response in hemorrhaged rodents." *Shock* **32**(6): 601-607.

Mongan, P. D., Capacchione, J., et al. (2001). "Pyruvate improves cerebral metabolism during hemorrhagic shock." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **281**(2 50-2): H854-H864.

Mongan, P. D., Capacchione, J., et al. (2002). "Pyruvate improves redox status and decreases indicators of hepatic apoptosis during hemorrhagic shock in swine." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **283**(4 52-4): H1634-H1644.

Mongan, P. D., Fontana, J. L., et al. (1999). "Intravenous pyruvate prolongs survival during hemorrhagic shock in swine." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **277**(6 46-6): H2253-H2263.

Mongan, P. D., Karaian, J., et al. (2003). "Pyruvate prevents poly-ADP ribose polymerase (PARP) activation, oxidative damage, and pyruvate dehydrogenase deactivation during hemorrhagic shock in swine." *Journal of Surgical Research* **112**(2): 180-188.

Moochhala, S., Wu, J., et al. (2009). "Hemorrhagic shock: an overview of animal models." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **14**: 4631-4639.

Moore, E. E., Moore, F. A., et al. (2009). "Human Polymerized Hemoglobin for the Treatment of Hemorrhagic Shock when Blood Is Unavailable: The USA Multicenter Trial." *Journal of the American College of Surgeons* **208**(1): 1-13.

Morita, K., Ihnken, K., et al. (1995). "Studies of hypoxemic/reoxygenation injury: without aortic clamping. IV. Role of the iron-catalyzed pathway: deferoxamine." *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **110**(4 pt. 2): 1190-1199.

Nagatomi, A., Sakaida, I., et al. (1997). "Cytoprotection by glycine against hypoxia-induced injury in cultured hepatocytes." *Liver* **17**(2): 57-62.

Nichols, J. C., Bronk, S. F., et al. (1994). "Inhibition of nonlysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes." *Gastroenterology* **106**(1): 168-176.

Nishimura, Y. und Lemasters, J. J. (2001). "Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia." *Cell Death and Differentiation* **8**(8): 850-858.

O'Donnell-Tormey, J., Nathan, C. F., et al. (1987). "Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells." *Journal of Experimental Medicine* **165**(2): 500-514.

Park, P. O., Haglund, U., et al. (1990). "The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion." *Surgery* **107**(5): 574-480.

Park, R. (1980). "Lactic acidosis." *Western Journal of Medicine* **133**(5): 418-424.

Peitzman, A. B., Harbrecht, B. G., et al. (1995). "Hemorrhagic shock." *Current Problems in Surgery* **32**(11): 925,927-1002.

Perel, P. und Roberts, I. (2007). "Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients." *Cochrane Database of Systematic Reviews*(4).

Petrat, F., Boengler, K., et al. (2011). "Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism(s) against ischaemia-reperfusion injury: current knowledge." *British Journal of Pharmacology*.

Petrat, F. und De Groot, H. (2011). "Protection against severe intestinal ischemia/reperfusion injury in rats by intravenous resveratrol." *Journal of Surgical Research* **167**(2): e145-e155.

Petrat, F., Drowatzky, J., et al. (2011). "Protection from glycine at low doses in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine." *European Surgical Research* **46**(4): 180-187.

Petrat, F., Rönn, T., et al. (2011). "Protection by pyruvate infusion in a rat model of severe intestinal ischemia-reperfusion injury." *Journal of Surgical Research* **167**(2): e93-e101.

Petrat, F., Swoboda, S., et al. (2010). "Quantification of ischemia-reperfusion injury to the small intestine using a macroscopic score." *Journal of Investigative Surgery* **23**(4): 208-217.

Pfenninger, E., Nicolai, T., et al. (2010). Therapie des Volumenmangelschocks. Katastrophenmedizin. Leitfaden für die ärztliche Versorgung im Katastrophenfall

Munich (Germany), Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe. **5**.

Pinto, M. C., García-Barrado, J. A., et al. (1999). "Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(12): 4842-4846.

Qian, Q., Nath, K. A., et al. (2010). "Hemolysis and acute kidney failure." *American Journal of kidney diseases* **56**(4): 780-784.

Rana, M. W., Shapiro, M. J., et al. (2002). "Deferoxamine and hespan complex as a resuscitative adjuvant in hemorrhagic shock rat model." *Shock* **17**(4): 339-342.

Rana, M. W., Singh, G., et al. (1992). "Protective effects of preheparinization on the microvasculature during and after hemorrhagic shock." *Journal of Trauma* **32**(4): 420-426.

Raval, A. P., Lin, H. W., et al. (2008). "Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain." *Current Medicinal Chemistry* **15**(15): 1545-1551.

Robergs, R. A., Ghiasvand, F., et al. (2004). "Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **287**(3 56-3): R502-R516.

Rose, S., Pizanis, A., et al. (2000). "Starch-deferoxamine conjugate inhibits hepatocyte Ca<sup>2+</sup> uptake during hemorrhagic shock and resuscitation." *The Journal of trauma* **49**(2): 296-297.

Roskopf, K., Wagner, T., et al. (2001). "ACD-A is effective in preventing clots in cryopreserved autologous peripheral blood stem cell concentrates (PBSC) at the time of thawing." *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* **28**(SUPPL. 1): 57.

Russell, D. H., Barreto, J. C., et al. (1995). "Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat." *Shock (Augusta, Ga.)* **4**(1): 50-55.

Ryden, S. E. und Oberman, H. A. (1975). "Compatibility of common intravenous solutions with CPD blood." *Transfusion* **15**(3): 250-255.

Saiko, P., Szakmary, A., et al. (2008). "Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?" *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* **658**(1-2): 68-94.

Sato, H., Tanaka, T., et al. (2010). "A quantitative study of lung dysfunction following haemorrhagic shock in rats." *International Journal of Experimental Pathology* **91**(3): 267-275.



Shakibaei, M., Harikumar, K. B., et al. (2009). "Review: Resveratrol addiction: To die or not to die." *Molecular Nutrition and Food Research* **53**(1): 115-128.

Sharma, P. und Mongan, P. D. (2010). "Hypertonic sodium pyruvate solution is more effective than ringer's ethyl pyruvate in the treatment of hemorrhagic shock." *Shock* **33**(5): 532-540.

Shen, S. Q., Zhang, Y., et al. (2007). "Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes." *World Journal of Gastroenterology* **13**(13): 1953-1961.

Shindler, K. S., Ventura, E., et al. (2010). "Oral resveratrol reduces neuronal damage in a model of multiple sclerosis." *Journal of Neuro-Ophthalmology* **30**(4): 328-339.

Sih, K., Campbell, S. G., et al. (2011). "Ketamine in adult emergency medicine: controversies and recent advances." *The Annals of pharmacotherapy* **45**(12): 1525-1534.

Sogabe, K., Roeser, N. F., et al. (1996). "Differential cytoprotection by glycine against oxidant damage to proximal tubule cells." *Kidney International* **50**(3): 845-854.

Stein, H. J., Hinder, R. A., et al. (1990). "Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: Protective role of the antioxidant glutathione." *Surgery* **108**(2): 467-474.

Szaflarski, N. L. (1996). "Physiologic effects of normovolemic anemia: implications for clinical monitoring." *AACN clinical issues* **7**(2).

Tawadrous, Z. S., Delude, R. L., et al. (2002). "Resuscitation from hemorrhagic shock with ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats." *Shock* **17**(6): 473-477.

Tijssen, M. J. H., Peters, S. M. A., et al. (1997). "Glycine protection against hypoxic injury in isolated rat proximal tubules: The role of proteases." *Nephrology Dialysis Transplantation* **12**(12): 2549-2556.

Todd, S. R., Malinoski, D., et al. (2007). "Lactated Ringer's is superior to normal saline in the resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock." *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care* **62**(3): 636-639.

Traverso, L. W., Lee, W. P., et al. (1986). "Fluid resuscitation after an otherwise fatal hemorrhage: I. Crystalloid solutions." *Journal of Trauma* **26**(2): 168-175.

Tsai, Y. F., Liu, F. C., et al. (2011). "Role of Akt-Dependent Pathway in Resveratrol-Mediated Cardioprotection after Trauma-Hemorrhage." *The Journal of surgical research* **epublished ahead of print**.

Tubbs, R. J., Porcaro, W. A., et al. (2002). "Delta opiates increase ischemic tolerance in isolated rabbit jejunum." *Academic Emergency Medicine* **9**(6): 555-560.

Vingtdeux, V., Dreses-Werringloer, U., et al. (2008). "Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease." *BMC Neuroscience* **9**(SUPPL. 2).

Wagner, B. K. J. und D'Amelio, L. F. (1993). "Pharmacologic and clinical considerations in selecting crystalloid, colloidal, and oxygen-carrying resuscitation fluids." *American Journal of Hospital Pharmacy* **50**(6): 1262-1263+1267.

Wang, G., Zhao, M., et al. (2004). "Effects of glycine and methylprednisolone on hemorrhagic shock in rats." *Chinese Medical Journal* **117**(9): 1334-1341.

Wang, P., Singh, G., et al. (1990). "Preheparinization improves organ function after hemorrhage and resuscitation." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **259**(3 28-3).

Wheeler, M., Stachlewitz, R. F., et al. (2000). "Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production." *FASEB Journal* **14**(3): 476-484.

Wu, S., Wohlschlaeger, J., et al. (2009). "Evaluation of a modified HTK solution containing the new iron chelator LK 614 in an isolated rat liver perfusion model." *Journal of Investigative Surgery* **22**(5): 340-347.

Xia, L., Ding, F., et al. (2011). "Resveratrol attenuates apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells induced by high shear stress and proinflammatory factors." *Human Cell* **24**(3): 127-133.

Yang, R., Harada, T., et al. (2006). "Anti-HMGB1 neutralizing antibody ameliorates gut barrier dysfunction and improves survival after hemorrhagic shock." *Molecular Medicine* **12**(4-6): 105-114.

Yang, R., Zou, X., et al. (2012). "Ethyl pyruvate reduces liver injury at early phase but impairs regeneration at late phase in acetaminophen overdose." *Critical Care* **16**(1): [Epublished ahead of print].

Yu, H. P., Hsu, J. C., et al. (2008). "Resveratrol attenuates hepatic injury after trauma-hemorrhage via estrogen receptor-related pathway." *Shock* **30**(3): 324-328.

Zakaria, E. R., Spain, D. A., et al. (2002). "Resuscitation regimens for hemorrhagic shock must contain blood." *Shock* **18**(6): 567-573.

Zhong, Z., Arteel, G. E., et al. (1998). "Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: Prevention by dietary glycine." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **275**(4 44-4): F595-F604.

Zhong, Z., Enomoto, N., et al. (1999). "Glycine improves survival after hemorrhagic shock in the rat." *Shock* **12**(1): 54-62.

Zhong, Z., Wheeler, M. D., et al. (2003). "L-glycine: A novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **6**(2): 229-240.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

ACDA	Acid-Citrat-Dextrose-A
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Varianzanalyse
AP-1	engl.: Activator protein-1
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat engl.: cytokine-induced neutrophil
CINC	chemoattractant
CK	Kreatinkinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
ID	Innendurchmesser
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KGW	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
MAB	mittlerer arterieller Blutdruck
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-κB	engl.: Nuclear factor-κB
OD	Außendurchmesser
R	Ringer-Lösung
RL	Ringer-Laktat-Lösung
SBS	Säure-Basen-Status
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TPZ	Thromboplastinzeit

## 7.2. Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

### **Publikationen:**

Petrat F, Rönn T, de Groot H: Protection by pyruvate infusion in a rat model of severe intestinal ischemia-reperfusion injury. J Surg Res. 2011 May 15; 167(2):e93-e101. Epub 2010 Jan 1.

Rönn T, Lendemans S, de Groot H, Petrat F: A new model of severe hemorrhagic shock in rats. Comp Med. 2011 October 61; 5: 1-8.

Rohrig R, Rönn T, Lendemans S, Feldkamp T, de Groot H, Petrat F: Adverse effects of resuscitation with lactated Ringer's compared to Ringer's solution after severe hemorrhagic shock in rats. In Press

### **Tagungsbeitrag:**

16. Workshop Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie, 25.-27. Nov. 2010, Xanten  
Vortrag: „Ringer vs. Ringer-Lactat: Einfluss des Flüssigkeitsersatzes im hämorrhagischen Schock der Ratte“

### **Poster:**

9. Forschungstag der medizinischen Fakultät, Universität Duisburg-Essen. 12. Nov. 2010, Essen  
Titel: „Ringer vs. Ringer-Lactat: Einfluss des Flüssigkeitsersatzes im hämorrhagischen Schock der Ratte“

### 7.3. Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name:	Rönn
Vorname:	Thomas
Anschrift:	Augsburgerstr.105, 28215 Bremen
Geburtstag und Geburtsort:	01.04.1983, Neuwied
Familienstand:	ledig

#### Schulbildung

1989-1993	St. Walburgis Grundschule, Leubsdorf am Rhein
1993-2002	Privates staatlich anerkanntes Gymnasium der Franziskanerinnen Nonnenwerth im Rhein
2002	Abitur

#### Studium

2003-2008	Studium der Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
2008	Abschluss Diplom Biologe

#### Berufliche Erfahrung

2008-2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen
-----------	--

#### Promotion

2008-2012	Promotion, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen
-----------	---

